

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL II



ESTUDIO FILOGENÉTICO DEL GRUPO DE "*RHIZOCARPON GEOGRAPHICUM*" (LÍQUENES, *RHIZOCARPACEAE*, ASCOMYCOTA)
ANÁLISIS CONTRASTADO DE LOS CARACTERES MORFOLÓGICOS Y LOS
PATRONES BIOGEOGRÁFICOS

PHYLOGENETIC STUDY IN THE *RHIZOCARPON GEOGRAPHICUM*
GROUP (LICHENS, *RHIZOCARPACEAE*, ASCOMYCOTA)
CONSTRUCTING ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL CHARACTERS AND
BIOGEOGRAPHIC PATTERNS

TESIS DOCTORAL DE:

BEATRIZ ROCA VALIENTE

DIRIGIDA POR:

**ANA M. CRESPO DE LAS CASAS
SERGIO PÉREZ ORTEGA
LEOPOLDO GARCÍA SANCHO**

Madrid, 2013

**Estudio filogenético del grupo de *Rhizocarpon geographicum*
(Líquenes, *Rhizocarpaceae*, *Ascomycota*).
Análisis contrastado de los caracteres morfológicos y
los patrones biogeográficos**

**Phylogenetic study in the *Rhizocarpon geographicum* group
(Lichens, *Rhizocarpaceae*, *Ascomycota*).
Contrasting analysis of morphological characters and
biogeographic patterns**



BEATRIZ ROCA VALIENTE

TESIS DOCTORAL / PhD
Madrid, 2013



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia
Departamento de Biología Vegetal II

**Estudio filogenético del grupo de *Rhizocarpon geographicum*
(Líquenes, Rhizocarpaceae, Ascomycota). Análisis contrastado de
los caracteres morfológicos y los patrones biogeográficos**

Memoria de Tesis Doctoral

Beatriz Roca Valiente

Tesis dirigida por:

Dra. Ana M. Crespo
de las Casas
F. de Farmacia (UCM)

Dr. Sergio Pérez
Ortega
MNCN (CSIC)

Dr. Leopoldo García
Sancho
F. de Farmacia (UCM)

En, Madrid, a 22 de Febrero de 2013

Dña. Ana M. Crespo de las Casas, Doctora en Ciencias Biológicas y Catedrática de Botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, **Don Sergio Pérez Ortega**, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador del Departamento de Biología Ambiental del Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) y **Don Leopoldo García Sancho**, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Informan:

La presente Tesis Doctoral titulada “**Estudio filogenético del grupo de *Rhizocarpon geographicum* (Líquenes, Rhizocarpaceae, Ascomycota). Análisis contrastado de los caracteres morfológicos y los patrones biogeográficos**”, ha sido realizada bajo su dirección por la Licenciada en Ciencias Biológicas **Beatriz Roca Valiente**, para optar al Grado de Doctor con mención de Doctorado Europeo, y al estar concluida, autorizan su presentación para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste firman el presente informe en Madrid 22 de Febrero de 2011.

Vº Bº Director de Tesis

Dra. Ana M. Crespo de las Casas

Vº Bº Director de Tesis

Dr. Sergio Pérez Ortega

Vº Bº Director de Tesis
Dr. Leopoldo García Sancho

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, gracias a la financiación proporcionada por una ayuda para la Formación de Personal Investigador BES-2007-16763 asociada al proyecto POL 2006-08405, concedido ambos por el desaparecido Ministerio de Ciencia e Innovación del estado español.

El mismo programa FPI financió dos estancias breves en el extranjero:

-National Museum of Nature and Science, (国立科学博物館, TNS), en Tsukuba, Japón.

-Naturmuseum Senckenberg, en Frankfurt am Main, Alemania.

A mi padre, Ángel Roca.

*Cuando te contestes con ser simplemente tú mismo,
y no te compares ni compitas,
todos te respetarán.*

Lao Tse. Tao Te Ching (ca. s. V a.C)

AGRADECIMIENTOS

No puedo dar por concluida la tesis sin agradecer a tantas personas que han estado a mi lado durante todos estos años y que me han ayudado de una u otra manera. Gracias:

A mis directores de tesis, Ana, Leo y Sergio, primero por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación científica, por la confianza que depositaron en mí, por su paciencia en mis buenos y malos momentos, por su disposición a enseñar y aprender, por sus consejos y por invertir mucho de su tiempo y esfuerzo en la supervisión y revisión de este trabajo.

De mis dos estancias en el extranjero: al Dr. Yoshihito Ohmura por su colaboración y la acogida en Japón. Al Dr. Christian Printzen por sus comentarios e ideas sobre mi trabajo y estar siempre disponible para la discusión. Debo agradecer en ambos casos el apoyo de "las" técnicas de laboratorio, sin él no podría haber aprovechado tanto mis estancias, no nombro aquí a nadie por miedo a olvidarme de alguien. Especialmente debo recordar a Fernando Fernández-Mendoza porque hizo que mi estancia en Frankfurt fuera más enriquecedora de lo que hubiera esperado, profesional y personalmente. Muchas Gracias. 感謝. Danksagung.

A la Unidad de Genómica (Parque Científico de Madrid, UCM), especialmente a Rosana y a Tomas, y a Ricardo García Mata del Servicio Informático de Apoyo a la Docencia y a la Investigación (UCM).

Al personal del Departamento de Biología Vegetal II, especialmente a Charo, Pilar y Manolo por estar siempre dispuestos a ayudarme, (aunque fuera en la hora de la fruta, tengo un ojo...). Al Dr. Pepe Pizarro, conservador del herbario MAF, por su disposición y apoyo indispensables para la tesis. A la Dra. Ana Pintado porque fue la primera que confió en mí, por su sinceridad y su animó para que solicitará la beca, muchas gracias.

A la Prof. Paloma Cubas por compartir tantos conocimientos y discutir mis resultados. Al Prof. Víctor Rico por sus recomendaciones, su disposición y su ayuda. Al Dr. Divakar y a la Dra. Del Prado por enseñarme en el laboratorio y prestarme ayuda siempre que la pedí. Al Dr. Ruibal por todo que es mucho.

Al Prof. José Antonio Molina por querer trabajar conmigo, por darme la oportunidad de participar en sus proyectos y ser un poquito más multidisciplinar.

A mis compañeros becarios, "pre y post", de la sala blanca, del herbario, del laboratorio de fisiología arriba y abajo, (estamos un poco desperdigados;;). Muchas gracias por las ideas, las colaboraciones, las comidas, los cafés, las cañas, los cotilleos, las salidas de campo, los viajes dentro y fuera (también gracias por los monetes, los elefantes, y los cerdos despistados en las dehesas)... vamos por estar ahí dispuestos a compartir. Probablemente sois los que mejor habéis comprendido todo "esto". Con especial cariño a Celia (sin ti los "tomaca" ya no son lo mismo), a Ana Lumbr. (mi sitio siempre será tu sitio) y a Mer. Si algo me llevó son unos cuantos buenos amigos, ellos ya lo saben (^_^).

A mi familia, numerosa, pero en especial a mi madre, Carmen, y a mis hermanas porque han sido, son y serán un apoyo fundamental. A mis sobrinxs, que sólo con pensar en ellos me sale una sonrisa y se me olvidan los males. A mi padre que se "fue" cuando todo esto no hacía nada más que comenzar, ojala estuvieras aquí... A él (mi padre) y a mi hermana Susana, que me enseñaron a luchar, a decir lo que pienso, a demostrar lo que valgo y a no agachar nunca la cabeza.

A mis amigxs por escucharme y comprenderme en todos los buenos y los malos momentos de los últimos 7 años, que no han sido pocos. A las "biolocas" especialmente por los últimos años duros que hemos pasado.

A David, mi compañero, mi amigo, mi sol... por quererme y cuidarme y dármelo todo sin pedirme nada. Porque la adversidad nos une más y cada día lo demostramos.

A todos los que se acordaron de mí en sus salidas de campo y me trajeron material.

A los que se han ofrecido a leerla, a los que no sabíais o no comprendíais lo que hacía, para qué servía, ni qué es un líquen, a los que me preguntaban: ¿para qué sirve doctorarse?, ¿y cuándo acabas?, ¿ya tienes fecha?, ¿otra vez te vas?, Espero que vuestras dudas se resuelvan, Porque ya está!!!

A todxs Gracias!!!

ÍNDICE / INDEX

ABREVIATURAS	i
ABREVIATURAS PARA LAS LOCALIDADES ESTUDIADAS	ii
VOCABULARIO UTILIZADO EN LATÍN Y EN INGLÉS	iii
ABSTRACT (Resumen amplio en Inglés)	1
INTRODUCTION	1
AIMS AND STRUCTURE	2
METHODOLOGY AND RESULTS	3
CONCLUSIONS	4
INTRODUCCIÓN GENERAL / GENERAL INTRODUCTION	5
A.- El género <i>Rhizocarpon</i> Ramond ex DC	7
B.- Las especies amarillas del género <i>Rhizocarpon</i>	12
C.- La delimitación de especie; su interpretación en hongos liquenizados y dentro del grupo de <i>Rhizocarpon geographicum</i>	18
D.- Caracteres utilizados en la delimitación específica dentro del grupo de <i>Rhizocarpon geographicum</i>	21
E.- Ecología y distribución	31
F.- Biogeografía	32
G.- Análisis de los caracteres moleculares del micobionte	34
H.- Análisis de los caracteres moleculares del fotobionte	36
J.- Relevancia del estudio del grupo de <i>Rhizocarpon geographicum</i>	37
OBJETIVOS / AIMS	41
METODOLOGÍA GENERAL / GENERAL METHODS	47
A.- Material biológico	49
B.- Método de extracción de ADN	50
C.- <i>Loci</i> utilizados, amplificación de las secuencias de ADN y condiciones de PCR	51
D.- Purificación y secuenciación de los productos de PCR	54
E.- Alineamiento de secuencias, modelos evolutivos de sustitución de nucleótidos y análisis filogenéticos	56
CAPÍTULO 1 / CHAPTER 1	59
Descripción detallada de las especies y revisión de las especies tipo del grupo de <i>Rhizocarpon geographicum</i> / Species description and type species revision in the <i>Rhizocarpon geographicum</i> group	
CAPÍTULO 2 / CHAPTER 2	91
Variabilidad Genética y Morfológica del grupo de <i>Rhizocarpon geographicum</i> en la Península Ibérica / Genetic and Morphologic Variability in the <i>Rhizocarpon geographicum</i> group from the Iberian Peninsula	

ÍNDICE / INDEX

CAPÍTULO 3 / CHAPTER 3	147
Estudio de la variabilidad intra-específica de la región de copia múltiple ITS nu y valor informativo de los genes de copia única en el grupo de <i>Rhizocarpon geographicum</i> / Study of the intra-specific variability of nuITS region and Single-copy genes value in the <i>Rhizocarpon geographicum</i> group	
CAPÍTULO 4 / CHAPTER 4	169
Diversidad, filogenia y patrones biogeográficos de los fotobiontes del grupo de <i>Rhizocarpon geographicum</i> / Diversity, phylogeny and biogeographic patterns in the photobionts of the <i>Rhizocarpon geographicum</i> group	
CAPÍTULO 5 / CHAPTER 5	205
Filogenia, morfología y patrones biogeográficos del grupo de <i>Rhizocarpon geographicum</i> a escala mundial / Worldwide phylogeny, morphology and biogeographic patterns in the <i>Rhizocarpon geographicum</i> group.	
DISCUSIÓN GENERAL / GENERAL DISCUSSION	237
CONCLUSIONS	245
CONCLUSIONES	246
BIBLIOGRAFÍA / LITERATURE CITED	247
APÉNDICE 1 / APPENDIX 1	261
APÉNDICE 2 / APPENDIX 2	262
APÉNDICE 3 / APPENDIX 3	280
APÉNDICE 4 / APPENDIX 4	282
APÉNDICE 5 / APPENDIX 5	287

ABREVIATURAS

ac.: ácido

AMOVA: Análisis de la varianza molecular (*Analysis of molecular variance*)

e. g.: Ejemplo (*exempli gratia*)

Fig.: Figura

Fst Φ : Índice de fijación referido a los análisis de la AMOVA (*Fixation Index*)

GLC: Concepto General de Linaje

gr.: Grupo

I: Lugo, solución acuosa al 1,5% de Yodo en 10% de yoduro potásico

i. e.: Esto es (*id est*)

Indv.: Individuo

Is.: Isla/s

ITS: Segmento Transcrito Interno (*Internal Transcript Segment*)

KOH ó K: Potasa, 10% hidróxido potásico

Leg.: Recolector (*legit*)

LSU: Subunidad Grande (*Large SubUnit*)

(MC)³: Método de *Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo*

ML: *Maximum likelihood* /máxima verosimilitud

MP: Máxima parsimonia

mt: Mitocondrial (referido a ADN mitocondrial)

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

Pd: Parafenildiamina

p. ej.: por ejemplo

pers. comm.: Comunicación personal (*personal communication*)

PN: Parque Nacional

pp: Probabilidad posterior del análisis bayesiano

R.: *Rhizocarpon*

Rf: Tiempo de retención (retention time)

sec.: Sección

sist.: Sistema (referido a sistema montañosos)

s. lat.: En sentido amplio (*sensu lato*)

sp.: Especie

s. str.: En sentido estricto (*sensu stricto*)

SSU: Subunidad pequeña (*Small SubUnit*)

subsp.: Subespecie

sub.: Bajo el binomen

subgen.: Subgénero

syn.: Sinónimo (*synonymon*)

T.: *Trebouxia*

var.: Variedad (*varietas*)

ABREVIATURAS PARA LAS LOCALIDADES ESTUDIADAS

Al: Alaska. Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway
AnC: Antártida Continental. Victoria Land, Monte Kyffin
AnM_(1,2): Antártida Marítima. Isla Livingston
Ba: España. Salamanca. Sistema Central/ Sierra de Francia. Las Batuecas
C: España. Cáceres. Montes de Toledo / Sierra de las Villuercas. Río Ibor
Ch_(1,2): Chile. Cordillera de los Andes.
CG: España. Islas Canarias. Isla de El Hierro. Cruce de Guarazoca
CR: España. Ciudad Real, Solana del Pino
Ec: Escocia, Isla Skye
EU₁: Estados Unidos. Montañas Rocosas, Colorado, Condado de Chaffee
EU₂: Estados Unidos. California, Sequoia National Park
G: España. Ávila. Sistema Central/ Sierra de Gredos. Los Barrerones, Plataforma de Gredos
LP: España. Ávila. Sistema Central/ Sierra de Gredos. Las Parameras-La Hija de Dios
Hu: España. Pre-Pirineo. Sierra de Guara, Huesca
I: India. Uttaranchal, Badhrinath, en el camino de Manas a las Cataratas de Vasundhara
L: España. Segovia. Sistema Central/ Sierra de Somosierra-Ayllón. Pico Lobo
M₍₁₋₄₎: España. Islas Canarias. Macaronesia
Mx_(1,2): México, Volcán Iztaccíhuatl
N: España. Madrid. Sistema Central/ Sierra de Guadarrama. La Najarra
Nz: Nueva Zelanda, Styx Creek, Central Otajo
Pi: España. Lérida. Pirineos. Parque Nacional de Aigüestortes. Subida al Montardo.
PI: Península Ibérica
SE: Portugal. Sistema Central. Sierra de Estrella. La Torre
SF: España. Salamanca. Sistema Central. Sierra de Francia, Peña de Francia
SN: España. Granada. Sistema Bético. Sierra Nevada. Observatorio de Mohón del Trigo
Sv₍₁₋₄₎: Islas Svalbard, Longyearbyen
T: Toledo, Parque Nacional de Cabañeros. Las Becerras.
TF₍₁₋₃₎: Chile. Tierra de Fuego.
Tw_(1,2): Taiwan, Monte Nanhu

VOCABULARIO UTILIZADO EN LATÍN Y EN INGLES

Annealing: hibridación, anillamiento referido a los cebadores

Bootstrap: re-muestreo estadístico, se usa para aproximar el sesgo o la varianza de un muestreo estadístico.

Box-plots: Gráficos de cajas y bigotes

Burn-in: periodo de descarte al alcanzar la estabilización del análisis

Cluster: conjunto, grupo

Gap: espacio/hueco, referido a las posiciones de nucleótidos en la secuencia de ADN que quedan vacíos

Likelihood: probabilidad

Locus/loci: del latín lugar, se refiere a marcador genético

Nomina ambigua: nombre ambiguo

Outgroup: grupo externo

Pairwise: emparejado

Primer: iniciador, cebador

Random: al azar, aleatorio

Runs: carreras (referido al número de veces que corre el análisis)

Spot Test: test de manchado

AUTORÍA DE FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS.

Todas las figuras y fotografías incluidas en la tesis son de autoría propia, salvo en las que se ha indicado oportunamente la procedencia de la fuente.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Lichens are a mutualistic association between fungi (mycobionts) and photoautotrophic green algae or cyanobacteria (photobionts) (Hawksworth & Honegger 1994). The mycobiont protects the photobiont against desiccation and the photobiont gets energy from photosynthesis for both symbionts. Through this collaborative symbiosis, lichens can colonize large distributional ranges and many different environments, from the driest deserts to the poles. Species name and systematics in lichens concern the mycobiont (Kirk *et al.* 2001).

Rhizocarpon Ramond ex DC. (Lamarck & De Candolle 1805) is one of the most difficult genera of lichens to study due to the inconsistency of taxonomical relevant morphological characters. The most widely-used classification of *Rhizocarpon* genus divides it into taxa with a yellow thallus containing rhizocarpic acid (subgenus *Rhizocarpon*) and those with a non-yellow-thallus lacking rhizocarpic acid (subgenus *Phaeothallus*) (Thomson 1967). *Rhizocarpon* DC. is a large genus containing approximately 200 species (Fletcher *et al.* 2009). Together with *Catolechia* Flot., *Epilichen* Clem. and *Poeltinula* Hafellner form the *Rhizocarpacea* family (lichenized Ascomycota).

We study here the yellow species of *Rhizocarpon* genus which form the complex *Rhizocarpon geographicum* (Runemark 1956a). Species included in the group are among the most important primary colonizers in de-glaciated landscapes, and are often used in lichenometry for dating moraines (Porter 1981; Armstrong 1983; Armstrong y Smith 1987; Benedict 1988; Innes 1986; Sancho y Pintado 2004; Bradwell y Armstrong 2007; Sancho *et al.* 2007a; Zhu y Yu 2007; Jomelli *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2011). *R. geographicum* group includes currently almost 26 yellow pigmented species with I+ blue reacting medulla and muriform ascospores and has a worldwide distribution. The taxonomy of the group has only suffered minor changes during the last 50 years. However, species delimitation within the group is still a highly problematic issue because the taxa are very variable (Poelt 1988). In fact, specialists described many species though recognizing that the group needs a deep revision.

AIMS AND STRUCTURE

We analysed 17 taxa of the group from 14 localities worldwide distributed, using two approaches: morphological and molecular data are compared to solve this challenge.

Chapter 1 provides the original description for every species studied; a revision of type species and own materials studied for each one. Based on the types' observation and the original descriptions we selected morphological characters to consider.

Chapter 2 studies the inter- and intraspecific variation in the *R. geographicum* group in the Iberian Peninsula using the results from two sets of characters: anatomic-morphological and chemical- and molecular characters. We compare the results with a possible geographic pattern in the Iberian Peninsula.

In **Chapter 3** we test the intra-specific variability of region nuITS DNAr by cloning and extracting DNA from different parts of the same thallus. We check also the single-copy genes value (RPB1 region) in the group.

The photobionts in the group have been study for the first time in **Chapter 4**. The phylogeography, genetic structure and ecological pattern of the photobionts are studied. Using molecular methods we identify the photobionts of the group. A comparative study of the phylogenetic structure of myco- and photobionts is also present in order to clarify the specificity and/or selectivity patterns.

In **Chapter 5** we establish the phylogeny of *R. geographicum* group to assess consistencies in a worldwide scenery. Also, we compare the phylogenetic results versus five significant morphological characters inferred in Chapter 2. The types species studied in Chapter 1 were compared with our materials. Molecular diversity was analyzed in the different lineages and sampled areas, and the biogeographic patterns in *R. geographicum* group were discussed.

METHODOLOGY AND RESULTS

The specimens were identified according to the keys. We studied the morphological and chemical characters using traditional techniques: dissecting microscope, light microscopy, TLC and spot test observations (Chapter 1, 2 and 5).

We compared the information retrieved from morphological and chemical characters with molecular data obtained from the nuITS and mtLSU rDNA regions. A total of 100 specimens from Iberian Peninsula (Chapter 2) and 152 specimens from 14 localities worldwide distributed (Chapter 5) for mycobionts were analyzed. 229 new sequences have been generated for nuITS and mt LSU rDNA regions.

New data sets from nuITS -obtained for cloning and new DNA extractions- and RPB1 sequences of 53 specimens from the Iberian Peninsula were analyzed (Chapter 3). Molecular data set from nuITS and *rbcL* regions were obtained from photobionts (Chapter 4). A total of 93 new sequences for photobionts have been produced.

Phylogenetic inference was performed using maximum parsimony (bootstrap $\geq 70\%$) analysis and bayesian (MC)³ tree sampling (pp ≥ 0.95): we have produced a total of 8 phylogenetic trees for the different analysis in Chapters 2, 3, 4 and 5.

Morphological characters were analysed using descriptive statistics: Pearson correlation and t-student (Chapter 2) and was illustrated by box-plots graphics (Chapter 2 and 5). Cluster analysis and Discriminant approach were used in Chapter 2.

CONCLUSIONS

“Morpho-species” included in the analysis showed polyphyletic patterns according with our results (Chapters 2 and 5). In fact, critical morphological and chemical characters were distributed in different clades of the phylogenetic tree.

Results Chapter 3 supported those in Chapters 2 and 5: We didn't detect a high number of polymorphisms enough to support the hypothesis of more than two different genotypes in the same thallus. Neither nuITS has a high intra-specific variability. The primers used in the amplification of the RPB1 region didn't provide more information on the phylogeny of the group.

The more common photobionts in the group are *Trebouxia jamesii* and *Trebouxia angustilobata* (Chapter 4). We didn't find specificity/selectivity nor co-evolution patterns with the corresponding micobionts in samples studied from a worldwide distribution. High intra-specific diversity in *T. jamesii* and *T. angustilobata* was observed.

Main Conclusion:

The phylogenetic study of the *Rhizocarpon geographicum* group reveals one supported lineage, including 229 specimens of 17 putative taxa, and it is consistent with the wide morphological concept of *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC., corresponding to Linnaeus' *Lichen geographicus*. Linnaeus (based in Dillenius) described it as “*Lichenoides nigro flavum, tabulae geograficae instar pictum*”. We complemented this description with ascospore characterization (brown-green and muriform or submuriform), and growing on non calcareous rocks with a bipolar, alpine and subalpine worldwide distribution. Long-distance dispersion could be the most probable way to explain the current distribution of both lichen symbionts.

For further information, we advise to read the abstract for each chapter and Conclusions.

INTRODUCCIÓN GENERAL

GENERAL INTRODUCTION

A.- El género *Rhizocarpon* Ramond ex DC.

El género *Rhizocarpon* Ramond ex DC. (1805) es uno de los géneros de hongos más difíciles de estudiar debido a la inconsistencia de la mayoría de sus caracteres morfológicos desde que fuera establecido por Ramond en la “Flore Française” (Lamarck y De Candolle 1805).

Muchas de las especies circunscritas en la actualidad en el género *Rhizocarpon* fueron incluidas durante el siglo XIX en el género *Lecidea* por la mayoría de los autores (Acharius 1810; Schaerer 1828; Tornabene 1848; Nylander 1881; Vaino 1883). A principios del siglo XX la discusión sobre la posición sistemática del género era patente, por ejemplo Zahlbruckner (1926) seguía la corriente de los investigadores del siglo XIX e incluía el género *Rhizocarpon* en la familia *Lecideaceae*. Otros autores, sin embargo, posicionaron el género o parte de él en otros géneros como *Buellia* (Tuckerman 1866, 1849; Dogde 1948; Darbishire 1923) o en *Diplotomma* como una sección de *Buellia* (Jatta 1880).

Arnold (1871), dividió el género *Rhizocarpon* en dos géneros: *Rhizocarpon* s. str. y *Catocarpus* (Körb.) Arnold. Fries (1874) acepta dicha división, pero reduce ambos géneros a secciones incluidas dentro del género *Rhizocarpon*; *Eurhizocarpon* Stiz. con esporas murales y *Catocarpus* (Körb.) Arnold con esporas bicelulares, pudiéndose encontrar especies amarillas de *Rhizocarpon* en ambas. Lynge (1932) acepta la división de Fries (1874) para el género en 2 secciones *Eurhizocarpon* y *Catocarpus* y propuso 7 categorías dentro de *Rhizocarpon*, basándose en sus propios estudios y en trabajos anteriores (e.g. Fries 1874; Nylander 1865, 1881; Vaino 1909).

Posteriormente, Räsänen (1942a y b, 1943a y b, 1944, 1947, 1949a y b) describe más de 45 especies y 60 variedades y formas basándose en el uso de los caracteres anatómicos y químicos, proporcionando numerosas unidades taxonómicas que dieron un elevado valor a la alta variabilidad intra-específica dentro del género. A nivel supra-genérico, Räsänen (1943c, 1951) incluye a *Rhizocarpon* en la familia *Lecideaceae*, dividiendo las especies amarillas en dos secciones *Lepidoma* (Räsänen, 1943a) y *Catocarpus* (Räsänen 1943a y c).

Más adelante, Runemark (1956a y b) en su monografía sobre los *Rhizocarpon* amarillos distribuye dichas especies en 4 grupos (*Superficiale*, *Alpicola*, *Viridiatrum* y *Geographicum*) y advierte que el conjunto de los cuatro probablemente formen un subgénero.

Existen trabajos más recientes en el género pero poco numerosos, como por ejemplo el de Thomson (1967) que estudia el género fundamentándose en recolecciones realizadas en el Ártico y en estudios anteriores de Nylander en dicha región (1865, 1881). Dividió el género en 2 subgéneros: uno de ellos contiene todas las especies de *Rhizocarpon* cuyos talos están compuestos por areolas amarillas con ácido rhizocárpico (subgen. *Rhizocarpon*, con 4 secciones) y el otro agrupa las especies con talos marrones y grises (subgen. *Phaeotallus*, con 3 secciones) (Figuras 1.a y b).



Figura 1.a.- *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC.



Figura 1.b.- *Rhizocarpon distinctum* Th. Fr. (Fuente www.stridvall.se).

Por otro lado Ozenda y Clauzade (1970) aceptan la partición propuesta por Arnold (1871) y separan *Rhizocarpon* en 2 subgéneros diferenciándolos por la septación en las ascóspora; subgen. *Catocarpus* con esporas con una única división y subgen. *Rhizocarpon* con esporas con varios septos o muriformes. Ozenda y Clauzade (1970) advierten que el límite entre ambos subgéneros no está claramente definido; en ciertos casos algunas especies amarillas con un único septo intercelular se han incluido en el subgen. *Rhizocarpon*.

Rhizocarpon Ramond ex. D.C es un género amplio que contiene aproximadamente 200 especies en el mundo (Fletcher *et al.* 2009), y es considerado como polifilético en su circunscripción actual (Ihlen y Ekman 2002). Se define por poseer talos epilíticos, areolados de color gris, marrón, blanco o el muy característico amarillo a amarillo verdoso; son crustáceos lisos a verrucoso-escumuloso, que crecen predominantemente en rocas silíceas, o muy raramente sobre rocas calcáreas o sobre otras especies de líquenes (especies liquenícolas); presenta generalmente protalos de color negro, gris o marrón. El córtex superior suele estar bien desarrollado de tipo más o menos paraplectenquimático, compuesto de células gelatinosas compactadas y por lo general carece de córtex inferior. Las células del córtex son morfológicamente no distinguibles de las células del protalo (Runemark 1956a; Fletcher *et al.* 2009).

Su médula, laxa, está formada por hifas sueltas y el fotobionte son algas unicelulares chlorococoides del género *Trebouxia* (Thomson 1967; Purvis *et al.* 1992; Feuerer y Timdal 2004; Fletcher *et al.* 2009). Los apotecios son sésiles hasta inmersos, negros, marginados, de tipo lecideino -con excípulo propio bien desarrollado y sin excípulo talino- planos a convexos, poligonales hasta circulares, aislados o creciendo rodeados de la areolas.

El epihimeno presenta pigmentos de color marrón, verde o violeta rojizo, y contiene frecuentemente cristales visibles con luz polarizada (Fletcher *et al.* 2009). El himenio puede ser hialino o presentar pigmentos en su parte superior y reacciona K/I + azul. Presenta paráfisis simples o generalmente ramificadas y anastomosadas -raramente simple y laxo-, con células grandes, cilíndricas y septadas. Las paráfisis se aglutinan gradualmente hacia el ápice engrosándose ligera o claramente según las especies (Runemark 1956a; Fletcher *et al.* 2009).

Los ascos son clavados a cilíndricos, bitunicados, de tipo *Rhizocarpon*, con dos paredes: la pared exterior, exoasco, no se expande pero se abre apicalmente y la pared interior elástica, endoasco, es parcialmente liberada desde el exoasco (Honegger 1982; Nash 1996; Fletcher *et al.* 2009). Presenta gelatina amiloide circundante y contienen entre 1 y 8 ascósporas por asco que pueden ser desde hialinas hasta de color verde-marrón, siendo bicelulares hasta muriformes y presentan halo, al menos en los estadios más tempranos.

El género es cosmopolita y sus especies se pueden encontrar tanto en zonas templadas como en ambos polos (Lynge 1932; Runemark 1956a y b; Feuerer 1991; Øvstedal y Smith 2001). De acuerdo al concepto actual del género (Thomson 1967; Hafellner 1984) éste se divide en 2 subgéneros: el subgen. *Phaeotallus* que abarca a las especies con talos marrones o de otros colores pero no amarillo, y el subgen. *Rhizocarpon* que comprende las especies con talo amarillo. Dentro de cada subgénero existen varios complejos de especies, más o menos, claramente delimitados, así el subgen. *Phaeotallus* contiene 3 secciones o complejos de especies: *Rittokense*, *Albothallus* y *Fuscothallus* (Thomson 1967), y el subgen. *Rhizocarpon* contendría 4 secciones, grupos o complejos de especies: *Superficiale*, *Alpicola*, *Viridiatrum* y *Rhizocarpon* o *Geographicum* (Runemark 1956a; Thomson 1967; Poelt 1988).

El género *Rhizocarpon* forma junto con *Catolechia* Flot., *Epilichen* Clem. y *Poeltinula* Hafellner la familia *Rhizocarpaceae* M. Choisy ex Hafellner 1984 (Hafellner 1984).

La familia se caracteriza por la presencia de excípulo lecideino, asco con capa amiloidela visible en su parte más apical y hamatecio compuesto por paráfisis ramificadas y anastomosadas (Hafellner 1984; Ihlen y Ekman 2002).

Su clasificación actual es (Lumbsch & Huhndorf 2010):

Phylum *Ascomycota* Caval. Sm. 1998.

Subphylum *Pezizomycotina* O.E. Erikss. & Winka. 1997.

Clase *Lecanoromycetes* O.E. Erikss. & Winka 1997.

Subclase *Lecanoromycetidae* P.M. Kirk, P.F. Cannon & J.C. David ex Lutzoni, Huhndorf & Lumbsch 2007.

Orden *Lecanorales* Nannf. 1932

Familia *Rhizocarpaceae* M. Choisy ex Hafellner 1984.

Sin embargo, la posición filogenética de la familia *Rhizocarpaceae* dentro del orden *Lecanorales* es también un tema controvertido y altamente discutido. Wedin *et al.* (2005) la sitúan dentro del orden *Lecanorales* s. str., sin embargo Miadlikowska *et al.* (2006) proponen el orden *Rhizocarpales* incluyendo en él las familias *Rhizocarpaceae* y *Catillariaceae* (Hafellner 1984). Lumbsch *et al.* (2007) definen el orden *Lecanorales* como polifilético situando a *Rhizocarpon* y *Sporastatia* en la base de *Lecanoromycetidae* pero fuera del orden *Lecanorales*. El trabajo más reciente de Schoch *et al.* (2009), sólo incluye dos taxones del género *Rhizocarpon*, *Rhizocarpon oederi* (Weber) Körb. y *R. superficiale* (Schaer.) Vain., a los que sitúa dentro de *Lecanoromycetes* pero fuera del orden *Lecanorales*, y hace referencia al orden *Rhizocarpales* -Fig. 2-.

Esta tesis se centra en el estudio de las especies amarillas del género *Rhizocarpon*, es decir, en el subgénero *Rhizocarpon* y más concretamente en las especies y subespecies del complejo *Rhizocarpon geographicum* (Runemark 1956a y b; Thomson 1967; Ihlen y Ekman 2002) -Tabla 1-.

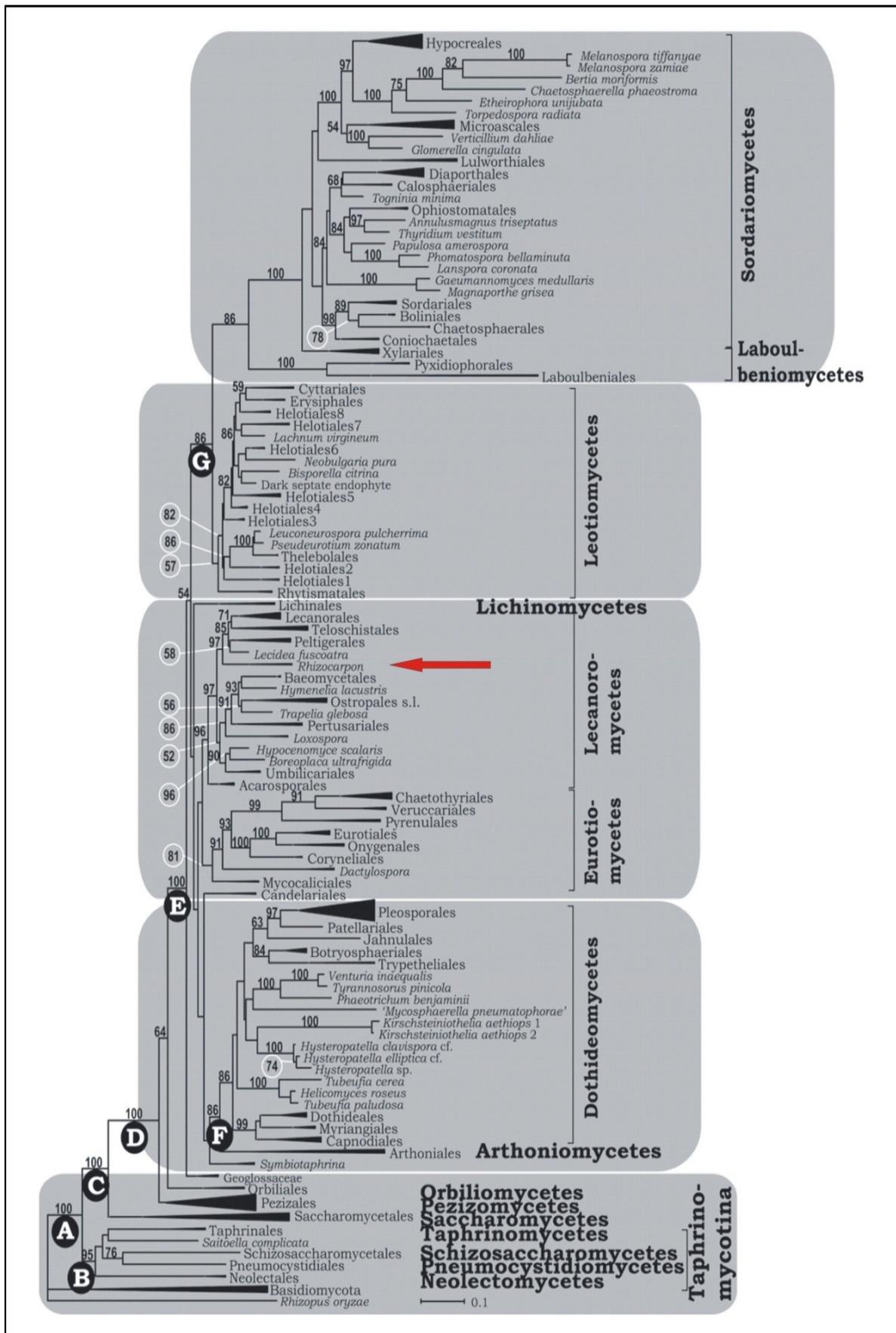


Figura 2.- Posición taxonómica actual del género *Rhizocarpon* (señalado con una flecha roja). Tomado de Schoch *et al.*, 2009. Árbol consenso de ascomicetes obtenido mediante análisis RAxML a partir del estudio de 6 genes, 3 codificantes de proteínas (RPB1, RPB2 y TEF1) y 3 genes ribosomales (nuLSU, nuSSU, mtSSU), para 434 taxones.

B.- Las especies amarillas del género *Rhizocarpon*

Podemos decir con seguridad que la primera mención a las especies amarillas del género *Rhizocarpon* se remonta a *Species Plantarum* donde Linneo (1753), describe 2 especies amarillas de *Rhizocarpon*; *Lichen geographicus* y *Lichen atrovirens*, aunque dicha descripción es muy somera, remitiendo a la obra de Dillenius (1742), y no existen especímenes de ambas especies en el herbario de Linneo (Runemark 1956a). No es sino hasta el siglo XX cuando las especies amarillas de dicho género son estudiadas y discutidas en profundidad.

Los trabajos de Nylander (1865, 1881, 1884 materiales de la Expedición Vega 1878-79) en el Estrecho de Bering y en el Este de Asia, de Fries (1874) en el norte de Europa, y de Lyngé (1928, 1932, 1936) sobre las especies del género en el ártico, fueron extensos investigando las especies amarillas y proponiendo diferentes divisiones taxonómicas, aunque limitados debido a su restricción geográfica.

En las décadas de los años 40 y 50 las especies amarillas de *Rhizocarpon* son estudiadas en mayor profundidad: Räsänen (1942a y b) centró sus estudios en *Rhizocarpon geographicum* y especies emparentadas en Finlandia y en Suramérica. Los caracteres más importantes sobre los que basó su estudio fueron las reacciones químicas frente a I, Pd y KOH en la médula, talo y epihimeno, así como en el tamaño de las ascósporas y los apotecios. Räsänen (1942a y b, 1943a, b y c, 1944, 1947, 1949a y b) llegó a describir 69 especies, variedades y formas distintas. Además aportó información muy valiosa sobre las especies amarillas de *Rhizocarpon* definiendo hasta 23 nuevas especies y estudiando a fondo la morfología, estableciendo así la base para lo que luego sería el trabajo más importante realizado sobre el subgen. *Rhizocarpon*.

Runemark (1956a y b) publicó lo que hasta el momento ha sido el estudio más exhaustivo de la taxonomía, distribución y ecología de las especies amarillas de *Rhizocarpon* en Europa. En estos trabajos amplió significativamente el área de observación de dichas especies, abarcando un número mucho más extenso de especímenes (entre 20.000 y 30.000), realizando numerosas observaciones y medidas de una gran cantidad de caracteres morfológicos y anatómicos, fundamentando la diferenciación de entidades taxonómicas sobre todo en la septación de las ascósporas, presencia o ausencia de pequeños gránulos oscuros en el epihimeno y la presencia o ausencia de polisacáridos en la medula que dieran reacción positiva (I+ añil) al lugol.

Propuso la hipótesis de que las especies amarillas de *Rhizocarpon* formaran un subgénero dentro de *Rhizocarpon* y definió cuatro grupos o complejos informales -sin categoría taxonómica- diferentes para las especies amarillas:

1°.- Grupo *Superficiale*; caracterizado por tener ascósporas uni-septadas pequeñas (11-18 μm de longitud), un himenio también pequeño (70-100 μm) cuya parte superior es roja oscura o raramente verde, tornándose más oscuros al reaccionar a la potasa (KOH). Su epihimenio contiene gránulos negros pequeños y no cristalizados. La médula puede reaccionar positiva o negativamente al lugol (I+ o -). Las especies del grupo tienen distribución bipolar, encontrándose además de en las regiones polares propiamente dichas, en altas montañas tanto de zonas templadas como tropicales. En este grupo el autor ubica 6 especies y 3 subespecies, entre ellas incluyó tres especies nuevas, i.e. *R. dispersum* Runem., *R. pusillum* Runem. y *R. parvum* Runem. -Tabla 1-.

2°.- Grupo *Alpicola*; con esporas uni-septadas grandes (18-32 μm de longitud), himenio más alto que en el grupo *Superficiale* (100-150 μm), rojizo, marrón o verdoso en su parte superior que reacciona positivamente con la KOH dando color marrón-rojizo a rojo-violeta o marrón verdoso a verde. La médula puede reaccionar positiva o negativamente al lugol (I + o -). Las especies del grupo se limitan a zonas árticas o de alta montaña de zonas templadas. Para este autor el grupo comprendía solamente 3 especies (*R. alpicola*, *R. atroalbescens* y *R. inarense*) -Tabla 1-.

3°.- Grupo *Viridiatrum*; con esporas muriformes (12-50 μm de longitud), himenio con una altura entre 80 y 180 μm , con pequeños gránulos cristalizados en el epihimenio. La parte superior del himenio se torna rojo oscuro o verde al reaccionar con la KOH y la medula reacciona negativamente al I. Runemark (1956a y b) limita el grupo a zonas templadas del hemisferio norte, indicando que algunas de las especies se encuentran solo en zonas del sur de Europa y en zonas templadas de Norte América y sólo una de las especies se podría encontrar en el hemisferio sur (*R. viridiatrum*). Sitúa dentro del grupo un total de 6 especies, dos de ellas las reconoce como nuevas, i.e. *R. subtile* Runem. y *R. tetrasporum* Runem. -Tabla 1-.

4°.- Grupo *Geographicum*; el grupo se caracteriza por tener esporas muriformes grandes (10-70 µm de longitud), himenio de entre 50 y 240 µm de altura, de verde a hialino, medula I positiva de color añil. El autor indica que la reacción a la KOH en la parte superior del himenio, el espesor del himenio, la forma y el tamaño de las esporas son los caracteres morfológicos más importantes para la taxonomía del grupo, al que define como cosmopolita a excepción de altitudes bajas en zonas tropicales y subtropicales. Incluye dentro del grupo 14 especies y 10 subespecies, 5 de las cuales las reconoce en aquel momento como especies nuevas; *R. lindsayanum* Räs. subsp. *kittilense* (Räs) Runem., *R. tinei* subsp. *vulgare* Runem., *R. tinei* subsp. *arcticum* Runem., *R. carpaticum* Runem. y *R. sorediosum* Runem. -Tabla 1-.

Más tarde, Thomson (1967) estudia el género en el Ártico y lo divide en dos subgéneros incluyendo a todas las especies amarillas en el subgen. *Rhizocarpon*, cómo ya había adelantado Runemark, y formaliza la división que hace este último en 4 secciones o grupos.

Tanto Feuerer (1978) en Baviera como Timdal y Holtan-Hartwig (1988) en Escandinavia y Poelt (1988) en Europa realizan estudios taxonómicos profundos de las diferentes especies del subgen. *Rhizocarpon*, proporcionando claves dicotómicas importantes para la determinación de las especies y subespecies amarillas pero sin llegar a un consenso en cuanto al número de especies que comprende el subgénero.

La clave quizás más completa y usada actualmente es la de Poelt (1988), en la que se sintetizan los resultados de los trabajos anteriormente comentados y otros (Runemark 1956a y b; Thomson 1967; Poelt y Vězda 1977; Timdal 1986) y de las propias observaciones realizadas por el autor. Poelt advierte de que el grupo *Geographicum* (al que él llama sección *Rhizocarpon*) probablemente contenga más especies de las descritas, entiende que esta insuficientemente clasificado debido a la plasticidad de los caracteres morfológicos haciendo a los taxones muy variables y difíciles de clasificar. Así mismo indica que las especies tienen diferentes quimiotipos cuya individualidad y distribución no ha sido suficientemente investigada. Aconseja identificar sólo materiales en verdadero buen estado y no juveniles, ya que interpreta que éstos podrían conducir a error. Poelt (1988) divide el subgénero, en esta clave, en 4 secciones similares a las de Runemark: *Superficiale*, *Alpicola*, *Viridiatrum* y *Rhizocarpon*.

Existen dos especies amarillas de *Rhizocarpon* endémicas de la Antártida y sobre las que no hay apenas literatura que precise su posición taxonómica dentro del subgen. *Rhizocarpon*. Una de ellas es *Rhizocarpon adarense* (Darb.) I.M. Lamb (1948), con talos crustáceos pequeños de color verde-amarillento pálido, con areolas convexas dispersas en el protalo, reacción negativa al lugol en la médula, posee ácido rhizocárpico, apotecios negros más o menos angulares y convexos, ascos con 8 ascósporas de color más o menos marrón y con un septo (Øvstedal y Smith 2001). La otra es *Rhizocarpon nidificum* (Hue) Darb. (1923), con talo crustáceo, compuesto por areolas planas a convexas de color verdoso dispersas en el protalo negro, reacción positiva al lugol en la médula, con ácido rhizocárpico y a veces psorómico, apotecios negros angulares planos, con reacción positiva a la potasa de color rojo-violeta en su epihimeno, ascos con 8 ascósporas con 3 septos normalmente (Øvstedal y Smith 2001).

A *R. adarense* se le ha incluido aquí en el subgen. *Rhizocarpon* por poseer sólo ácido rhizocárpico y a *R. nidificum* dentro del subgen. *Rhizocarpon* y del grupo *Geographicum* por poseer ácido rhizocárpico, reacción positiva al lugol en su médula y esporas sub-muriformes (con 3 septos)

En esta tesis se tomó la determinación de denominar como grupo de *Rhizocarpon geographicum*, o *Rhizocarpon geographicum* s. lat., al grupo que contiene las especies de talos amarillos a verdosos del subgen. *Rhizocarpon*, y queda definido como sigue en base a Runemark (1956a) y Poelt (1988): talo crustáceo saxícola que crece en rocas silíceas y otros materiales ácidos, areolado plano a convexo (sus areolas suelen ser muy subdivididas), de color amarillo a amarillo-verdoso. Himenio más bien alto (50-400 μ l), desde hialino a color verde según la especie, mucilaginoso, con paráfisis en forma de red, cuyas células apicales son transparentes y clavadas. La parte superior del himenio puede reaccionar a la potasa (KOH al 10%) dando un color rojo-violáceo. Los apotecios lecideinos son de color negro y carecen de reborde o excípulo talino, crecen entre las areolas del talo y son cóncavos, planos a convexos, con asco clavado unitunicado de tipo *Rhizocarpon*. Sus ascósporas son murales con 2 o 4 septos de transversales a fuertemente muriformes provistas de halo, desde transparentes a de color verdoso o marrón, suelen ser 8 por asco.

El protalo o hipotalo, -sinónimos según la definición dada por “Dictionary of the fungi”, Kirk *et al.* 2001-, es negro fácilmente visible, la médula reacciona siempre positivamente al lugol dando color añil, y puede reaccionar positivamente a la parafenildiamina (Pd) dando color amarillo a naranja o color teja. (Runemark 1956a; Poelt 1988).

De esta manera se agrupa el nombre dado por Runemark (1956a) a este complejo de especies y subespecies con el propuesto por Thomson (1967) y Poelt (1988) para definir el mismo complejo, incluyéndose en dicho grupo todas las especies citadas por ambos en sendos trabajos -Tabla 1-, en los cuales se ha fundamentado la investigación.

En la actualidad el “binomen” *Rhizocarpon geographicum* aparece en 85 taxones válidos -74 corresponden a variedades o formas y 11 a subformas o subespecies-, según Mycobank (consultado el 07/02/2013; Crous *et al.* 2004). Por otro lado, el Index Fungorum (consultado el 07/02/2013, Kirk 2000)- incluye 95 taxones distintos, 90 se refieren a variedades o formas y 15 a subformas o subespecies, de los cuales 26 son los aceptados a nivel específico y sub-específico.

La Tabla 1 muestra las diferentes especies y subespecies pertenecientes a los diferentes grupos del subgen. *Rhizocarpon* según los trabajos de Runemark (1956a) y de Poelt (1988). En ella se muestra las especies y subespecies que se han considerado dentro del grupo de *R. geographicum* tal y como se han denominado en este trabajo. A partir de este momento nos referiremos a estos taxones como grupo de *Rhizocarpon geographicum* o *R. geographicum* s. lat.

Tabla 1. Especies y subespecies del subgénero *Rhizocarpon* (especies amarillas).

Grupo Superficiale	<i>R. dispersum</i> Runem. <i>R. effiguratum</i> (Anzi) Th. Fr. <i>R. norvegicum</i> Räs. <i>R. parvum</i> Runem. <i>R. pusillum</i> Runem. <i>R. superficiale</i> (Schaer.) Vain. subsp. <i>boreale</i> Runem. <i>R. superficiale</i> (Schaer.) Vain. subsp. <i>splendidum</i> (Malme) Runem. <i>R. superficiale</i> (Schaer.) Vain. subsp. <i>superficiale</i>
Grupo Alpicola	<i>R. alpicola</i> (Hepp) Rabh. <i>R. eupetraeoides</i> (Nyl.) Blomb. Forss. [syn. <i>R. atroalbescens</i> (Nyl.) Zahlbr.] <i>R. chionophiloides</i> (Vain.) Vain. <i>R. inarense</i> (Vain.) Vain. [syn. <i>R. alpicola</i> auct, <i>R. chionophilum</i> Th. Fr. planta]
Grupo Viridiatrum	<i>R. atrovirellum</i> (Nyl.) Zahlbr. <i>R. dinothetes</i> Hertel & Leuckert <i>R. kakurgon</i> Poelt. <i>R. lusitanicum</i> (Nyl.) Arn. <i>R. oportense</i> (Vain.) Räs. <i>R. subtile</i> Runem. <i>R. tetrasporum</i> Runem. <i>R. viridiatrum</i> (Wulf.) Kőerb.
Grupo de <i>Rhizocarpon geographicum</i>	<i>R. atroflavescens</i> Lyngé <i>R. carpaticum</i> Runem. <i>R. drepanodes</i> Feuerer <i>R. ferax</i> H. Magn. <i>R. furax</i> Poelt & Wirth <i>R. geographicum</i> (L.) DC. subsp. <i>arcticum</i> (Runem.) Hertel [syn. <i>R. tinei</i> subsp. <i>arcticum</i> Runem.] <i>R. geographicum</i> (L.) DC. subsp. <i>diabasicum</i> (Räs.) Poelt & Vězda in Haswksworth, James & Coppus [syn. <i>R. tinei</i> subsp. <i>diabasicum</i> (Räs.) Runem.] <i>R. geographicum</i> (L.) DC. subsp. <i>frigidum</i> (Räs.) Hertel [syn. <i>R. tinei</i> subsp. <i>frigidum</i> (Räs.) Runem.] <i>R. geographicum</i> (L.) DC. subsp. <i>geographicum</i> [syn. <i>R. tinei</i> subsp. <i>vulgare</i> Runem.] <i>R. geographicum</i> (L.) DC. subsp. <i>prospectans</i> (Räs.) Hawksw. et Sowter [syn. <i>R. tinei</i> subsp. <i>prospectans</i> (Räs.)] <i>R. intermediellum</i> Räs. <i>R. lecanorinum</i> Anders [syn. <i>R. lecanora</i> (Flk.) Lyngé.] <i>R. macrosporum</i> Räs <i>R. nidificum</i> (Hue) Darb. <i>R. papillatum</i> Vězda & Poelt <i>R. pulverulentum</i> (Schaer.) Räs. [syn. <i>R. atroflavescens</i> subsp. <i>pulverulentum</i> (Schaer.) Runem.] <i>R. rapax</i> Wirth y Poelt <i>R. ridescens</i> (Nyl.) Zahlbr. <i>R. riparium</i> (Räs.) subsp. <i>lindsayanum</i> (Räs.) Thoms. [syn. <i>R. lindsayanum</i> Räs.] <i>R. riparium</i> (Räs.) subsp. <i>riparium</i> Räs. [syn. <i>R. lindsayanum</i> Räs. subsp. <i>kittilense</i> (Räs.) Runem.] <i>R. saanaëense</i> Räs <i>R. solediosum</i> Runem. <i>R. sphaerosporum</i> Räs. <i>R. sublucidum</i> Räs. <i>R. tavaresii</i> Räs. <i>R. tinei</i> (Tornab.) Runem.

C.- La delimitación de especie; su interpretación en hongos liquenizados y dentro del grupo de *Rhizocarpon geographicum*

A pesar de la dificultad de delimitar empíricamente las especies, los conceptos contemporáneos de especie comparten la visión común de que las especies pueden ser segmentos de los linajes formados por las meta-poblaciones que evolucionan separadamente (De Queiroz 1998, 1999, 2007; Lumbsch y Leavitt 2011).

Este concepto permite delimitar las especies basándose en diferentes criterios o propiedades empíricas asociadas a la formación (definición) de un linaje: fenotípicas, ecológicas, geográficas, evolutivas o filogenéticas (De Queiroz 2007). El recurrente interés de las ciencias taxonómicas por poder reflejar la filogenia de las especies se ha traducido en un enfoque predominante basado en los datos genéticos (Sites y Marshall 2004; O'Brien *et al.* 2005; Knowles y Carstens 2007; Vieites *et al.* 2009; Carstens y Dewey 2010; Yang y Rannala 2010). En el marco del concepto unificado de especie (De Queiroz 2007) distintas cualidades -tales como monofilia, coalescencia, etc.- aportarán un mayor grado de corroboración de una especie si confluyen en diferentes linajes putativos (De Queiroz 2007).

En los hongos liquenizados encontrar y aplicar el criterio apropiado -y la cualidad adecuada- así como los conjuntos de herramientas analíticas, sigue siendo uno de los mayores desafíos para la delimitación empírica de las especies (Wirtz *et al.* 2008; Crespo y Pérez-Ortega 2009). Con frecuencia se ha utilizado como carácter un rasgo que resulta ambiguo; en otras ocasiones el número de caracteres usados ha sido muy escaso porque no se disponía de otros. La validación cruzada utilizando inferencias a partir de múltiples criterios empíricos o propiedades en combinación con el manejo de conjuntos operativos de datos se ha demostrado que es lo que permite establecer hipótesis más sólidas sobre los límites de las especies (Dayrat 2005; Duminil *et al.* 2006; O'Brien *et al.* 2009, Ruiz-Sánchez y Sosa 2010). Como consecuencia, desde que se ha hecho posible el manejo de los marcadores moleculares, en diferentes grupos de líquenes se ha intentado utilizar los datos genotípicos, que siempre numerosos y de lectura más inmediata, como referencia enfrentándolos a los caracteres morfo-químicos disponibles y también a los eco-geográficos.

Confrontación de caracteres genotípicos y fenotípicos en líquenes

En los hongos liquenizados, como en los no liquenizados, la delimitación de especies basada en criterios fenotípicos (morfo-químicos) ha resultado difícil y a veces incongruente con los criterios genotípicos (filogenéticos).

La gran plasticidad fenotípica de algunos individuos o poblaciones y/o la escasez de caracteres conducen a veces a delimitaciones de linajes morfológicos inconsistentes (Grube y Hawksworth 2007; Crespo y Pérez-Ortega 2009; Printzen 2010; Lumbsch y Leavitt 2011). Esto ocurre no sólo en los líquenes crustáceos, pero sin duda en ellos ya que pueden mostrar una heterogeneidad morfológica muy elevada y que sólo se puede atribuir en parte a las diferentes condiciones ecológicas (Muggia *et al.* 2008).

Los resultados del análisis de los datos moleculares han verificado en muchos casos, especialmente en géneros complejos como *Usnea* (Articus *et al.* 2002; Wirtz *et al.* 2006; Lumbsch y Wirtz 2011; Truong 2012) o *Parmelia* (Crespo *et al.* 2001, 2007, 2010; Blanco *et al.* 2006), la discordancia con las delimitaciones específicas basadas en criterios morfo-químicos (Grube y Kroken 2000). Por ello ha resultado imprescindible la revisión del concepto de especie en muchos de estos grupos enfrentando la congruencia entre linajes filogenéticos y “morfo-especies”¹. Por otro lado, estos y otros estudios han puesto de manifiesto que no siempre linajes filogenéticos monofiléticos presentan necesariamente diferencias morfológicas perceptibles (Articus *et al.* 2002; Argüello *et al.* 2007; Ferencová *et al.* 2010, Del Prado *et al.* 2010), traducándose más bien en la presencia de especies crípticas o semicrípticas (Crespo y Pérez-Ortega 2009).

Delimitación de especies en el grupo de *Rhizocarpon geographicum*

Dentro del grupo de *Rhizocarpon geographicum* se han reconocido un elevado número de especies con diferente grado de consenso. Todas las especies descritas basan su reconocimiento en caracteres morfológicos y/o químicos. A lo largo de todo el siglo XX los distintos especialistas en el grupo (Lynge 1936; Räsänen 1942a y b, 1944, 1949b; Runemark, 1956a; Thomson, 1967; Feuerer 1978) han ido describiendo especies y subespecies basándose en diferencias sutiles, al mismo tiempo que se realizaba la sinonimia de otras.

¹Se está denominando “morfo-especie” a las especies reconocidas como tal cuyas relaciones filogenéticas son desconocidas o cuando éstas no respaldan el concepto filogenético de especie.

Los estudios filogenéticos han confirmado que la agrupación infragenérica realizada en *Rhizocarpon* no es natural (Ihlen y Ekman 2002). Caracteres anatómicos como la tabicación de las ascósporas o químicos, como la presencia o ausencia de ácido rhizocárpico han evolucionado en repetidas ocasiones en el transcurso de la evolución dentro del género (Ihlen y Ekman 2002; Clayden 2004). De hecho, el subgénero *Rhizocarpon* está caracterizado y definido por un carácter químico; presencia de ácido rhizocárpico, que confiere el color amarillo a los talos (Thomson 1967), sin embargo, Timdal y Holtan-Hartwig (1988) encuentran ácido rhizocárpico en poblaciones o especímenes de *R. geminatum* -una especie no amarilla-, ubicada en el subgen. *Phaeotallus* que no debiera tener este ácido según la división realizada dentro del género *Rhizocarpon* por Thomson (1967).

En el estudio monográfico más reciente sobre los *Rhizocarpon* de color amarillo, Clayden (2004) agrupa todas las especies del grupo de *Rhizocarpon geographicum* presentes en el norte de Gales en 5 fenotipos distintos basados en la anatomía y la química de los individuos estudiados, pero indica que es necesario una aproximación genética para confirmar dichos fenotipos y aclarar la división específica dentro del grupo.

La identificación de las especies del grupo mediante las floras, claves y trabajos monográficos habituales (Lyngé 1932; Räsänen 1942a y b, 1949a y b; Runemark 1956a; Thomson 1967; Feuerer 1978; Poelt 1988 etc.) resulta complicada ya que la propia descripción de los caracteres no es idéntica en cada una de ellas y además se solapan medidas cuantitativas, incluso las referidas a las esporas. Esta situación de ambigüedad y/o falta de claridad en la definición de las especies no es rara en los líquenes y es incluso muy frecuente en los grupos representados por especies de pequeña talla y de hábito crustáceo (Muggia et al 2008; Vondrák et al. 2009; Spribille et al. 2011), aunque se hace especialmente complicado en el grupo de *R. geographicum* no sólo por la elevada plasticidad de sus caracteres morfológicos asociada probablemente a adaptaciones al hábitat sino también a la aparición de dichos caracteres varias veces en la evolución de un grupo tan primitivo como al que nos referimos (Ihlen y Ekman 2002). Así, en éste como en otros grupos se hace necesario el uso de técnicas moleculares tanto para la identificación de las especies como para su delimitación.

D.- Caracteres utilizados en la delimitación específica dentro del grupo de *Rhizocarpon geographicum*

La controversia en la delimitación taxonómica de las distintas especies y subespecies del grupo de *Rhizocarpon geographicum* es debida, sin duda, a la variabilidad de los caracteres morfológicos y anatómicos utilizados en la delimitación de los distintos taxones. Se ha estudiado y analizado en profundidad dichos caracteres, tradicionalmente usados en la delimitación del grupo, con el fin de intentar dilucidar su valor taxonómico.

A continuación se describen estos caracteres morfológicos y químicos según han sido utilizados por los distintos especialistas en trabajos recientes o de mayor relevancia (Räsänen 1942a y b, 1943a y b, 1944, 1947, 1949b; Runemark 1956a; Thomson 1967; Feuerer 1978; Poelt 1988; Clayden 2004).

1.- Talo y Protalo.

El talo es crustáceo saxícola, que crece sobre materiales ácidos, las areolas se desarrollan en un protalo de color negro fácilmente visible, y bien desarrollado en los márgenes, encontrándose dispersas en él o muy juntas sin que a veces se pueda visualizar fácilmente la presencia de este -Fig. 3.a y b-.

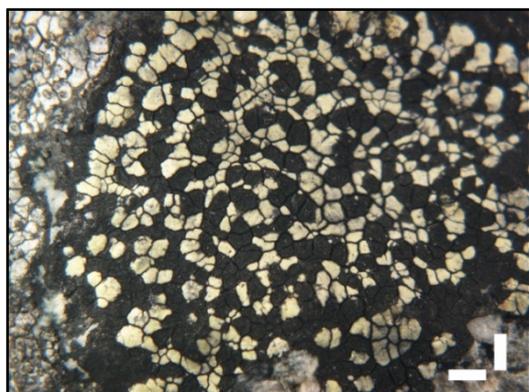


Figura 3.a.- Talo de *R. macrosporum*
MAF-17689. Escala 1mm.

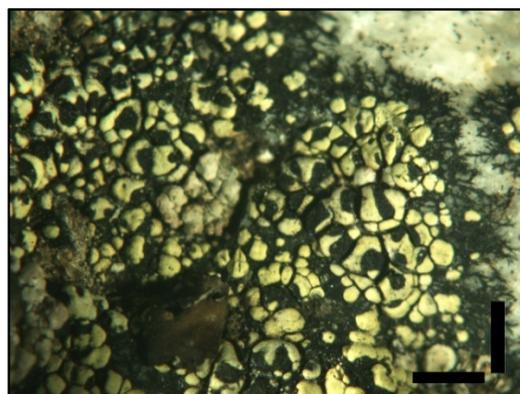


Figura. 3.b.- Talo de *R. lecanorinum*
MAF-16705. Escala 1mm.

El córtex superior esta normalmente bien desarrollado de tipo paraplectenquimático, es blanquecino a verdoso o amarillo intenso al microscopio óptico (Poelt 1988) -Fig. 4.a y b-. El grosor del córtex, de la médula, así como de la capa de algas es muy variable dentro incluso de individuos de la misma especie. (Runemark 1956a), siendo el grosor de este determinante para la resistencia de los individuos a las condiciones propias de los hábitats donde se desarrollan (Feuerer 1978; De la Torre 2002).

La médula está formada por hifas intercaladas, sueltas y dispuestas en varias direcciones. Formada en su parte superior por un estrato de algas, cuyo límite inferior es a menudo difuso. Existe muy poca o ninguna variación en el tamaño y la forma de las células de las hifas en las diferentes especies. La médula es de color blanco, reacciona positivamente al realizar el test por manchado (*spot-test*) con lugol dando color añil (Runemark 1956a; Feuerer 1978; Poelt 1988) y al Pd pudiendo dar reacción positiva de color amarillo, naranja o rojo teja dependiendo de las especies, o bien negativa. También es reactiva a la potasa dando color amarillo, o negativa, siendo en la mayoría de los casos KOH-.

La reacción positiva al lugol delimita el grupo de *R. geographicum* (Räsänen 1942b, 1943a, 1949a; Runemark 1956a; Thomson 1967; Poelt 1988) mientras que la reacción al Pd es un carácter discriminante para algunas de las especies del grupo (Räsänen 1942b, 1943a, 1949a; Runemark 1956a; Thomson 1967; Timdal y Holtan-Hartwig 1988; Poelt 1988), y la reacción positiva a la KOH en la médula no aporta demasiada información ya que únicamente, para *R. sphaerosporum* (Poelt y Vězda 1977; Poelt 1988) y para *R. lecanorinum* (Feuerer 1978) sería reactiva de color amarillo y no siempre. Por ello se analizó en profundidad el metabolismo secundario de la médula por TLC (Culberson 1972).

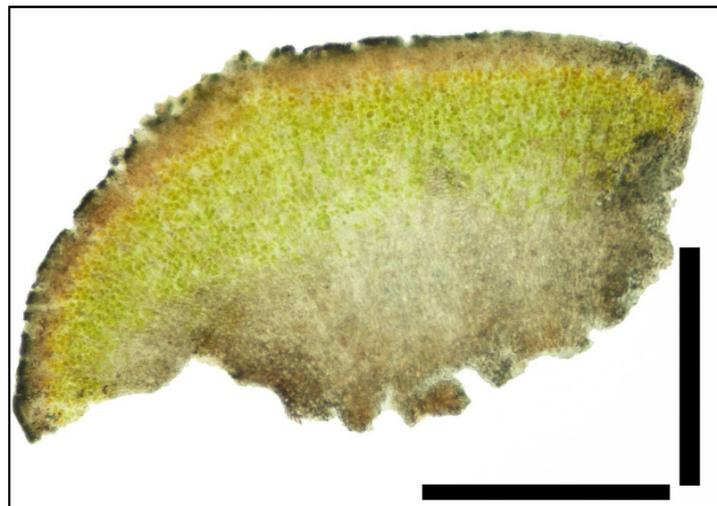


Figura 4.a.- Sección transversal Areola de transversal de *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16650. Escala 100 μ m.

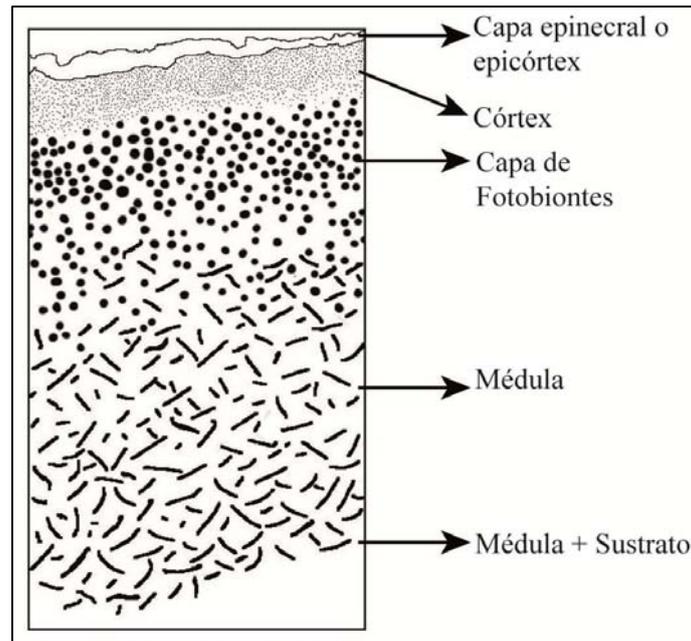


Figura 4.b.- Esquema Sección del Talo de *R. geographicum* s. lat.

Las areolas son de color amarillo débil casi blanquecino en algunas especies a amarillo intenso verdoso en otras y que puede variar dentro de una misma especie según la exposición del individuo a la luz solar. Con formas angulares o semi-circulares -Fig. 3.a y b-, de superficie convexa a plana, pueden estar subdivididas, considerándolas entonces como areolas secundarias, se pueden encontrar en especies como *R. riparium* subsp. *riparium* o *R. tinei*. En algunas especies como *R. lecanorinum*, *R. drepanodes* o *R. ferax* las areolas son en forma de collar convexas que rodean totalmente al apotecio.

La intensidad en la pigmentación, la forma y el tamaño de las areolas así como la presencia de areolas en forma de collar, el tamaño del talo a grandes rasgos y la presencia de un protalo visible y bien desarrollado son caracteres morfológicos que se han investigado, ya que han sido utilizados en los distintos trabajos precedentes y considerados importantes por los especialistas para poder definir e identificar las distintas especies y subespecies del grupo (Runemark 1956a; Thomson 1967; Poelt 1988; Timdal y Holtan-Hartwig 1988 etc.).

Desarrollo del talo de *Rhizocarpon geographicum* s. lat.

Con respecto al crecimiento del talo existen 4 factores fundamentales que intervienen en la formación de los talos maduros en las especies del grupo de *Rhizocarpon geographicum* -Fig. 5-; la formación de la primera areola, el crecimiento y/o la división de las areolas, la confluencia de diferentes areolas, y la fusión de cada uno de los pequeños talos para formar grandes individuos (Asta y Letrouit-Galinou 1995).

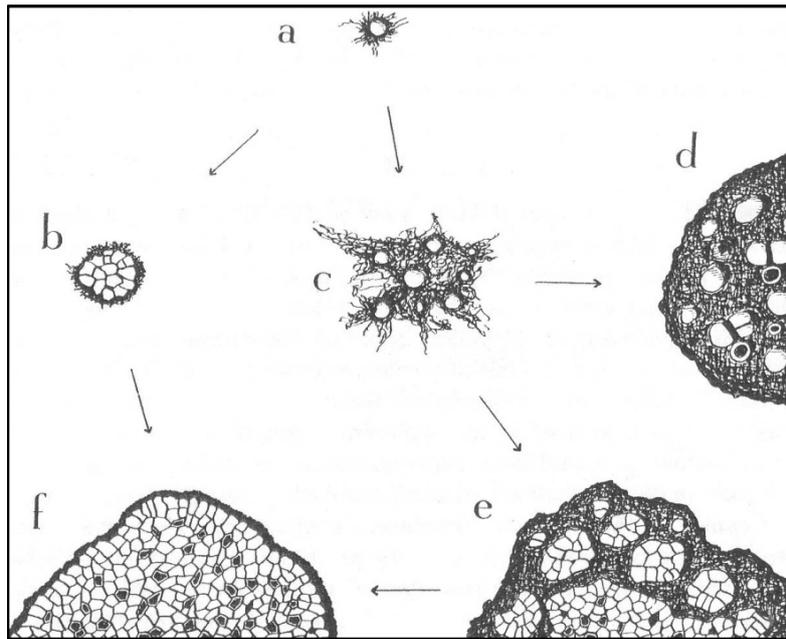


Figura 5.- Formación del talo de *Rhizocarpon geographicum* s. lat.
 Tomado de Runemark (1956a).
 a→ Formación de la primera areola.
 b y c→ Crecimiento y/o división de las areolas.
 d, e, f→ Confluencia de diferentes areolas, y fusión de cada uno de los pequeños talos formados para formar grandes individuos.

Aunque se han observado incluso diferencias en el desarrollo del talo entre las distintas especies del grupo, -e.g. Clayden (2004) encontró diferencias fundamentales en el desarrollo del talo liquénico entre individuos de *R. lecanorinum* y *R. geographicum* s. str.- en general en *R. geographicum* s. lat. la germinación de las ascóspora da lugar a un protalo en el cual se forma la primera areola (Asta y Letrouit-Galinou 1995).

Alternativamente, otra hipótesis atribuiría la formación de la areola primaria a la captación de células libres del alga por las hifas del protalo, mientras que las areolas secundarias se desarrollarían a partir de zoosporas procedentes del talo (Armstrong y Smith 1987). Mientras que en *R. lecanorinum* la formación de la primea areola se deriva directamente del contacto entre las ascósporas y el fotobionte y el protalo se forma secundariamente tras el crecimiento y expansión de la areola (Clayden 1998).

En general, la diferenciación del talo se produciría como resultado de la formación de la areola, asociándose este proceso con la formación y acumulación de ácido rhizocárpico en la capa cortical de las areolas. (Armstrong 2007). La radiación del protalo, entonces, se formaría e iniciaría desde el margen de la areola primaria creciendo hasta formar el anillo marginal típico de los individuos de *R. geographicum* s. lat. Después de las areolas primarias y de la formación del protalo marginal se irán formando nuevas areolas en el protalo marginal, a medida que este avanza radialmente sobre la superficie de la roca (Armstrong 2007).

2.- Apotecio

Los apotecios son de tipo lecideino, es decir, no presentan reborde talino y sí excípulo propio bien desarrollado. Se desarrollan desde el protalo y se encuentran localizados entre las areolas y en algunas especies éstas los rodean completamente como un collar (Fig. 6.a-e). De color negro, pueden ser poligonales o circulares, de superficie cóncava, plana o convexa, pero suelen ser planos en la mayoría de las especies del grupo cuando los individuos están maduros. Normalmente existe un número muy elevado de apotecios, solo en especímenes muy juveniles se observa la ausencia de estos, aunque en otros casos parece que se desarrollan a la par con las areolas. El tamaño es muy variable, desde apotecios muy pequeños de 0.3 mm, como por ejemplo en el caso de *R. geographicum* subsp. *frigidum*, a apotecios más grandes de 1.5 mm en individuos de la especie *R. sublucidum* (Runemark 1956a; Poelt 1988). Incluso dentro de las mismas especies los tamaños varían mucho, con rangos de diámetro amplios, como por ejemplo en *R. tinei* encontramos apotecios de entre los 0.3 mm a 1.5 mm (Runemark 1956a).

Los apotecios suelen ser de la misma altura (espesor) o algo menores que las areolas (Runemark 1956a). El apotecio está rodeado por un margen, descrito por Runemark (1956a) como *margo proprius* al que considera el responsable de la forma del excípulo, que en las especies del grupo se suele formar como un anillo alrededor del himenio. El margen es especialmente obvio en especímenes juveniles siendo más o menos indistinguible en los maduros.

El excípulo es originado por las hifas del ascoma (paratecio), suele ser oscuro como el hipotecio, o en algunas ocasiones blanco o incoloro como el tejido de la medula, esto ocurre pocas veces en ciertas especies, como en *R. lecanorinum*, *R. sublucidum* u otras especies cuando sus apotecios se encuentran completamente rodeados y pegados a las areolas (Fig. 7.a-e).

El hipotecio es de color marrón oscuro a negro carbón y no parece presentar valor taxonómico entre las especies del grupo (Fig. 6.a-e).

Runemark (1956a) describió la presencia de picnidios en las especies amarillas de *Rhizocarpon* como raros pero presentes en algunas pocas especies, inmersos en las areolas de apariencia globulosa. Por otro lado Clayden (1997) los describió como abundantes en los talos de *R. geographicum* subsp. *prospectans*. Sin embargo, no se han observado picnidios en ninguno de los especímenes del grupo de *Rhizocarpon geographicum* estudiados.



Figura 6.a.- Corte transversal del apotecio de *R. macrosporum* MAF-16700. Escala 100 μ m.

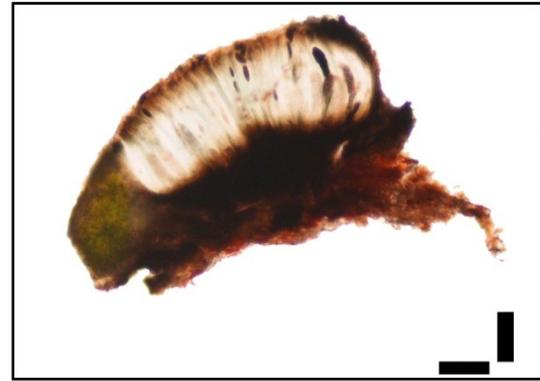


Figura 6.b.- Corte transversal del apotecio de *R. lecanorinum* MAF-16731. Escala 100 μ m.

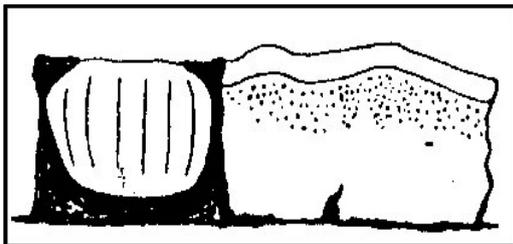


Figura 6.c.- Esquema del apotecio en sección transversal de *R. macrosporum*. Tomado de Runemark (1956a).

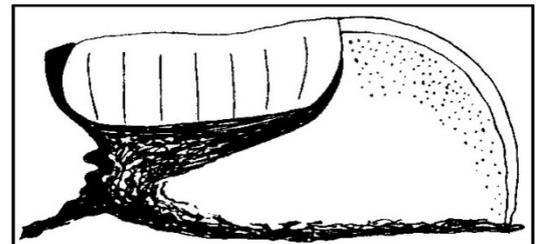


Figura 6.d.- Esquema del apotecio en sección transversal *R. lecanorinum*. Tomado de Runemark (1956a).

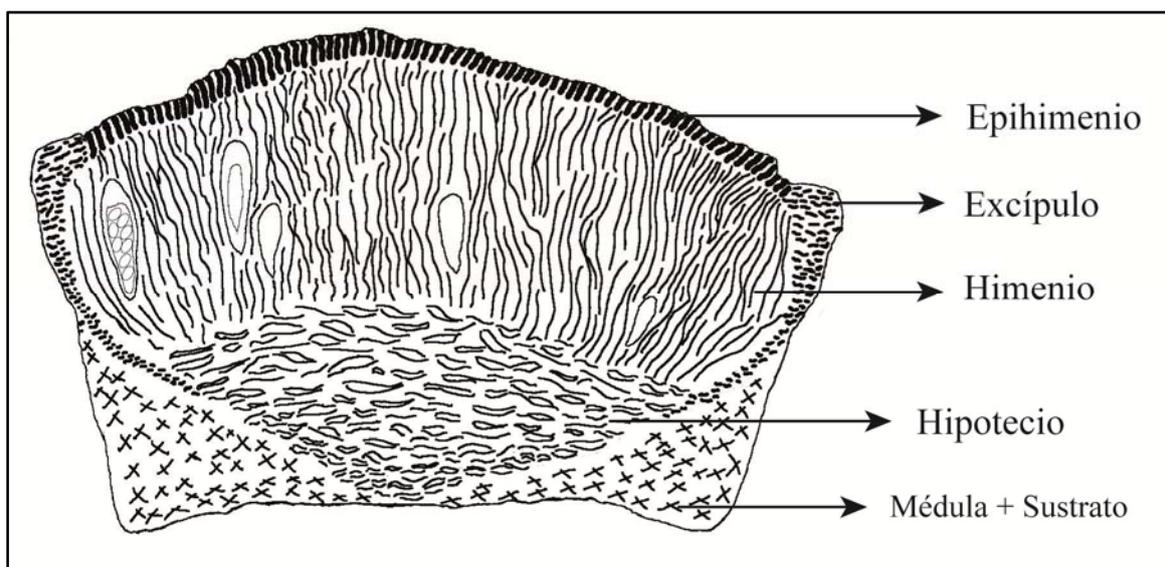


Figura 6.e.- Esquema del apotecio en sección transversal de *R. geographicum* s. lat.

3.- Himenio

Suele ser bastante alto comparado con otros grupos de líquenes, entre 100-240 μm (Räsänen 1942a y b; Räsänen 1944; Runemark 1956a), de aspecto mucilaginoso, normalmente de hialino a marrón, o de color verdoso uniforme -aunque se intensifica comúnmente en el ápice de las paráfisis- en determinados individuos de ciertas especies como *R. riparium* subsp. *lindsayanum* o *R. tavaresii*.

La parte superior del himenio, llamada epihimenio o epitecio -ápices de las paráfisis y gelatina himenial-, es normalmente de color marrón-rojizo, puede dar reacción positiva a la KOH, tornándose rojizo-violeta -Fig. 6.e- y no presenta gránulos en ninguna de las especies y subespecies del grupo. Este carácter ha sido uno de los más importantes a tener en cuenta en la identificación de las especies ya que en la totalidad de las floras y claves dicotómicas utilizadas resulta ser un carácter morfo-químico clave (Räsänen 1942a y b, 1949a; Runemark 1956a; Thomson 1967; Poelt 1988).

Las paráfisis son numerosas, ramificadas y se disponen unas aglutinadas a las otras. Las células son generalmente largas y cilíndricas y la septación entre ellas se suele apreciar fácilmente. Su parte superior se suele engrosar gradualmente hacia el ápice, que es clavado en las especies del grupo (Runemark 1956a) -Fig. 6.e y 7.b y c-.

Los ascos son de tipo *Rhizocarpon* (Honegger 1979, 1980; Hafellner 1984). Este tipo de asco parece sinapomórfico ya que se encuentra presente en todas las especies del género *Rhizocarpon*, siendo claramente diferentes a otros tipos de ascos observados en lecanorales. Se considera el más arcaico en los lecanorales (Honegger 1980), lo cual podría respaldar la hipótesis de que el género *Rhizocarpon* es un grupo filogenético basal (Honegger 1980; Miadlikowska *et al.* 2006). El asco *Rhizocarpon* posee un ápice que consiste en un tholus bien desarrollado, con reacción I- o I+ ligeramente azul, observándose en dicho ápice una estructura denominada “cap-like” que se tiñe de un azul fuerte al reaccionar con el lugol (Rambold *et al.* 1998), y sus mecanismos de dehiscencia son de tipo “jack-in-the-box” (Honegger 1979, 1980). Por lo demás tiene forma de maza o clavada, uni-tunicado (Hafellner 1984), con gelatina amiloidea circundante y contiene 8 ascósporas (Fig. 6.e y 7.a y c).



Figura 7.a.- Asco de tipo *Rhizocarpon*.
Preparación al microscopio en KOH.
Escala 100 μm .

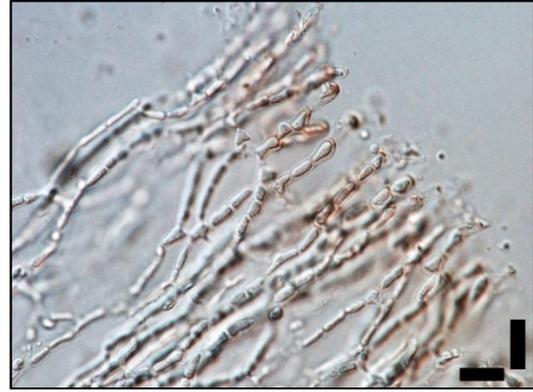


Figura 7.b.- Paráfisis de *Rhizocarpon geographicum* s. lat. Preparación al microscopio en azul de lactofenol.
Escala 10 μm .

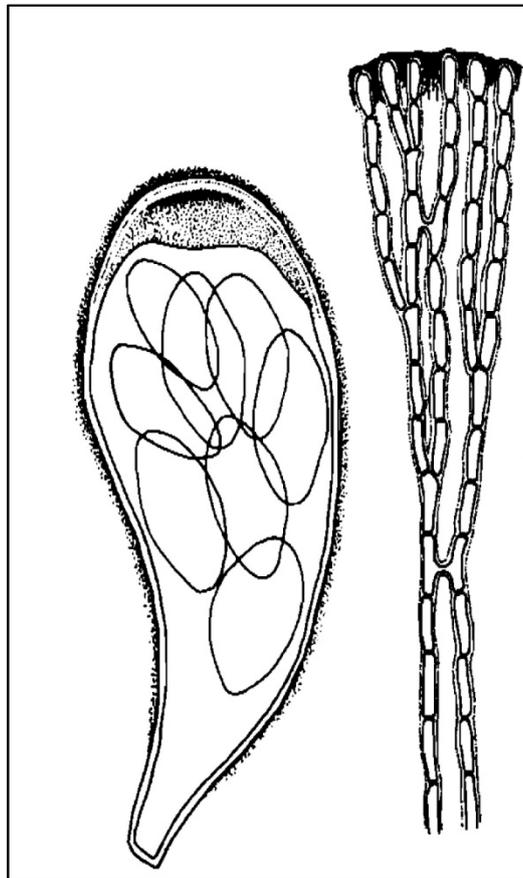


Figura 7.c.- Esquema de asco tipo *Rhizocarpon* y paráfisis de *Rhizocarpon geographicum* s. lat.
Tomado de Hafellner (1984).

4.- Ascósporas

Se encuentran en un número no superior a 8 por asco (Fig. 7.a), son muriformes, generalmente de color verde oliva a marrones. Presentan halo, al menos al comienzo del desarrollo. Tienen forma elipsoide y pueden llegar a presentar numerosas células (fuertemente muriformes). Las esporas observadas fueron de dos tipos:

a) Ascósporas sub-muriformes; con pocos septos longitudinales, no se observa al microscopio óptico más de 12 o 14 células por espora, como en *R. geographicum* subsp. *diabasicum*, *R. geographicum* subsp. *prospectans*, *R. geographicum* subsp. *arcticum*, *R. geographicum* subsp. *frigidum*, *R. geographicum* subsp. *geographicum* y *R. nidificum* (Runemark 1956a; Poelt 1988; Øvstedal y Smith 2001). En algunos casos los individuos observados de *R. tinei*, *R. tavaresii* y *R. riparium* subsp. *lindsayanum* (Poelt 1988) poseen menos de 16 células por espora, por lo que se les podría incluir también en este grupo -Fig. 8.a-.

b) Ascósporas eu-muriformes; con elevado número de septos longitudinales, se observa entre 16 y 42 células por espora. En este tipo de ascóspora se incluirían al resto de especies del grupo -Fig. 8.b-.

La longitud, anchura y número de células por espora son probablemente los caracteres morfológicos más importantes a tener en cuenta en el grupo de *R. geographicum*, ya que son fundamentales para diferenciar las especies y subespecies tal y como se han definido tradicionalmente (Lynge 1932; Runemark 1956a; Poelt 1988), por lo que se han tenido en muy en cuenta en este estudio.

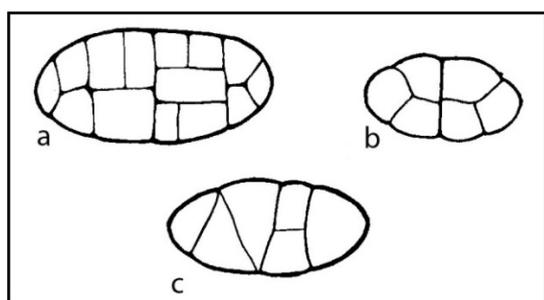


Figura 8.a.- Ascóspora sub-muriforme.
Tomado de Runemark (1956a)
a → *R. tavaresii*
b → *R. geographicum* subsp. *geographicum*
c → *R. geographicum* subsp. *frigidum*

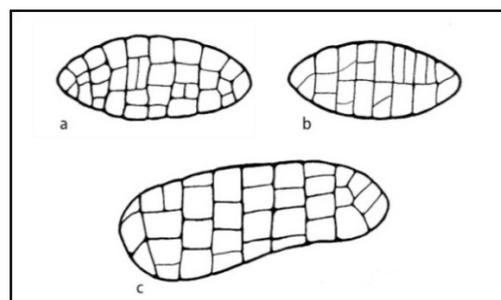


Figura 8.b.- Ascóspora eu-muriformes.
Tomado de Runemark (1956a).
a → *R. lecanorinum*
b → *R. macrosporum*
c → *R. sublucidum*

5.- Química

En los líquenes en general los metabolitos de la médula han sido utilizados en diversos trabajos como caracteres taxonómicos discriminantes en el rango de especie (Culberson 1986; Lumbsch 1998; Printzen 1999) siempre y cuando estén correlacionados con otros caracteres independientes. Sin embargo en la mayoría de los casos se les ha considerado más útiles para definir grupos sistemáticos de mayor rango (Elix 1993; Blanco 2004; Amo de Paz *et al.* 2010).

Se ha observado que muchas de las especies del grupo de *Rhizocarpon geographicum* tienen diferentes quimiotipos (Runemark 1956a; Poelt 1988; Timdal y Holtan-Hartwig 1988; Clayden 2004). Los compuestos que presentan suelen ser depsidos del orcinol (ácido girofórico), depsidonas del β -Orcinol (ácido norestético, ácido psorómico, ácido estético y complejo del ácido estético) y muy raramente depsidos del β -Orcinol (ácido barbático).

Usado como carácter principal para definir al subgénero *Rhizocarpon* (Thomson 1967), el ácido rhizocárpico (derivado del ácido pulvínico) se encuentra presente en todos los individuos estudiados.

El siguiente ácido más común en las especies del grupo es el ácido psorómico, sin embargo los individuos que carecen de este ácido, como *R. lecanorinum* o *R. macrosporum*, suelen presentar ácidos del complejo del ácido estético, ácido hipoestético o simplemente ácido estético como observaron Runemark (1956a) y Timdal y Holtan-Hartwig (1988).

Especies como *R. tinei*, *R. geographicum* subsp. *frigidum* o *R. geographicum* subsp. *prospectans* presentan a veces ácido girofórico (Timdal y Holtan-Hartwig 1988).

E.- Ecología y distribución

Todas las especies del grupo son saxícolas que crecen sobre rocas ácidas, a excepción de *R. saanaense* que puede crecer sobre rocas calcáreas (Runemark 1956a y b; Poelt 1988). A veces también se pueden encontrar en la superficie de construcciones realizadas por el hombre, como en murallas, tumbas o tejados, o en construcciones neolíticas como dólmenes o círculos de piedras en las que se usaban sustratos ácidos como granitos o pizarras (Romao y Rattazzi 1996; Nimis *et al.* 2002; Bradwell 2010).

En general los materiales para este estudio han sido recolectados sobre rocas ácidas como granito, cuarcitas y esquistos, donde convivían con otras especies de líquenes en estrecha competencia por el sustrato.

Las especies del grupo de *Rhizocarpon geographicum* son reconocidas, en su caracterización fitosociológica, como representativas de la clase *Rhizocarpetea geographici* Wirth 1980 (Creveld 1981; Sancho 1986), que se caracteriza por crecer desde rocas máficas, ricas en magnesio y hierro ligeramente alcalinas, a rocas félsicas, fuertemente ácidas. Las condiciones ambientales propias de *Rhizocarpetea* tanto para la luz, la exposición al viento, las condiciones de humedad, la cubierta nival, la temperatura como para el nivel trófico son de intensidad variable (Creveld 1981).

Sin embargo, algunas de las especies del grupo se encuentran asociadas a otras agrupaciones fitosociológicas; *R. lecanorinum* pertenece a al orden *Rhizocarpetalia alpicolae* Creveld 1981 y a la asociación *Lecanoro alpinae-Umbilicarietum deustae* (Frey ex Kalb 1970) Creveld 1981, que se caracteriza por encontrarse más frecuentemente en bloques pequeños y en pequeños afloramientos de roca, con exposición predominantemente sur, en zonas con presencias periódicas de humedad, cubierta nival, inundaciones por deshielo o largos periodos de lluvia. El principal factor limitante para esta asociación, ombrófilo y sustrato higrófilo periódico (Wirth 1972, 1980; Creveld 1981; Feuerer 1978; Sancho 1986). *R. lecanorinum* es por lo tanto apto para la rápida colonización de superficies recientemente expuestas de roca (Clayden 1998). Mientras que *R. sphaerosporum* es el taxón característico de la asociación *Rhizocarpo sphaerospori-Umbilicarietum hirsutae* Creveld 1981; crece más comúnmente sobre salientes de roca con exposición oeste-sur, ombrófilo y sustrato higrófilo periódico.

Se puede afirmar que dentro del grupo existen diferentes preferencias ambientales por parte de las distintas especies, que atienden más a condiciones micro-climáticas y micro-ecológicas que de la ecología general de los hábitats donde se encuentran, influyendo estas sobre las tasas de crecimiento de los talos y del desarrollo en general del líquen (John 1989), e.g.: *R. drepanodes*, *R. ferax*, *R. geographicum* subsp. *frigidum* y *R. saanaense* prefieren paredes verticales o sub-verticales (Sancho 1986).

R. ferax, *R. geographicum* subsp. *diabasicum*, *R. lecanorinum*, *R. riparium* s. lat., *R. saanaense*, *R. sphaerosporum* son o bien quionófilas, se encuentran en zonas con tendencia moderada a fuerte acumulación de nieve en invierno, o bien ombrófilas, de zonas bastante húmedas o sometidas esporádicamente a escorrentías (Creveld 1981; Sancho 1986). *R. riparium* s. lat., *R. geographicum* subsp. *frigidum* y *R. geographicum* subsp. *arcticum* son más esciófilos, mientras que *R. ferax*, *R. sphaerosporum* y *R. sublucidum* son más fotófilos. *R. macrosporum* y *R. sphaerosporum* son las especies más anemóforas del grupo y *R. tinei* y *R. sublucidum* son las especies más euroicas (Creveld 1981; Sancho 1986).

Las especies del grupo de *R. geographicum* se encuentran más comúnmente distribuidas en micro-hábitats más expuestos, pero no están restringidas a ellos (John 1989). El estudio realizado por John y Dale (1989), en las montañas Rocosas (Canadá) en 3 especies del grupo, *R. geographicum* s. str., *R. macrosporum* y *R. riparium*, mostró que en los nichos observados reflejan sólo una parte fundamental de los nichos posibles para cada especie. Además la separación de nichos podría deberse tanto a la competición por los recursos disponibles en el pasado para cada especie, como al resultado de adaptaciones encaminadas a la reducción de la competencia entre especies.

F.- Biogeografía

A nivel global, el grupo de *Rhizocarpon geographicum* está ampliamente distribuido, se pueden encontrar especies del grupo desde el Polo Norte (Nylander 1884; Lynge 1932; Thomson 1967; André 1986; Hansen 2006) a la Antártida (Øvstedal y Smith 2001; Sancho y Pintado 2004; Green *et al.* 2011), así como en cumbres alpinas y subalpinas de regiones templadas (Runemark 1956b; Poelt 1988; Asta y Letouit-Galinou 1995; Sancho *et al.* 2001) donde pueden hallarse desde altitudes bajas hasta las más elevadas cumbres montañosas, por encima de los 4500 m. (Poelt 1988). En zonas tropicales y subtropicales de ambos hemisferios se encuentran en altitudes muy elevadas (Rabatel *et al.* 2008; Rojas-Fernández *et al.* 2008).

Sin embargo algunas especies ven en principio limitada su distribución a ciertas aéreas: *R. ridescens* se distribuye por los Cárpatos, los Alpes y en la Selva Negra en Alemania y ha sido citado en dos ocasiones en la Península Ibérica (Runemark 1956b; Hertel 1971; Poelt 1988; Etayo *et al.* 1994; Hladun y Llimona 2002-2007).

R. papillatum se encuentra principalmente distribuido en los Alpes centrales (Poelt 1988) aunque ha sido citado en una ocasión en la Cordillera de los Pirineos en la Península Ibérica (Gómez-Bolea *et al.* 2000).

R. carpaticum y *R. ferax* se pueden encontrar en cumbres alpinas de los montes Tatras (Cordillera de los Cárpatos), en los Alpes, en Escandinavia, en Norte América y se han observado esporádicamente en zonas de la Península Ibérica (Runemark 1956a; Feuerer 1979; Poelt 1988; Hladun y Llimona 2002-2007). *R. carpaticum* también ha sido citado en el noreste y centro de Italia (Nimis y Martellos 2008), y en Sur América en Bolivia (Feuerer *et al.* 1998), mientras que *R. ferax* ha sido también citado en Norte América (Feuerer 2011) y se encuentra principalmente sobre esquistos o rocas eruptivas básicas.

R. intermediellum se distribuye en la zona alpina de los Alpes y Escandinavia (Räsänen 1943b; Runemark 1956b; Poelt 1988) y en Norte América (Feuerer 2011).

R. furax se encuentra sobre rocas ricas en silicatos en los Alpes o en la Selva Negra (Poelt 1970; Poelt 1988). *R. atroflavescens* en Novaya Zemlya y Spitzbergen (Lynge 1928; Runemark 1956b; Poelt 1988), en Cerdeña y en el centro de Italia (Nimis y Martellos 2008) y en Norte América (Feuerer 2011).

R. solediosum es una de las especies más difíciles de reconocer por lo que las citas sobre ella no son muy numerosas, se encuentra esporádicamente en la zona del subártico del norte de Europa, en las montañas de centro Europa y en el norte de Italia (Runemark 1956a; Poelt 1988; Nimis y Martellos 2008).

R. lecanorinum y *R. drepanodes* no suelen encontrarse por encima de los 2500 m. de altitud en zonas templadas, por lo que probablemente se traten de las especies más templadas de los *Rhizocarpon* amarillos (Feuerer 1978; Poelt 1988; Brodo 2001). *R. saanaense* es una de las pocas especies amarillas de *Rhizocarpon* que se puede encontrar a menudo sobre rocas ligeramente calcáreas, distribuida desde la zona subalpina a la zona de alta montaña europeas y asiáticas, en Escandinavia y en el ártico (Runemark 1956b; Poelt 1988).

R. geographicum subsp. *arcticum* sólo se encuentra en latitudes muy septentrionales o muy australes como Alaska, Canadá, Nueva Zelanda o la Antártida (Dodge 1973; Poelt 1988; Øvstedal y Smith 2001; Galloway 2007). De la misma manera el área de distribución *R. nidificum* es muy restringida ya que sólo se ha encontrado en el continente antártico (Darbishire 1923; Dodge 1973; Øvstedal y Smith 2001).

G.- Análisis de los caracteres moleculares del micobionte

En las últimas décadas son numerosos los trabajos filogenéticos y de sistemática que aúnan el análisis de secuencias de marcadores de ADN con el estudio de los caracteres morfológicos usados tradicionalmente, (e.g. Clerc 1998, Ihlen y Ekman 2002; Blanco *et al.* 2005, Lumbsch *et al.* 2008, Wirtz *et al.* 2008, Grube y Hawksworth 2007, Vondrák *et al.* 2009, Ferencova *et al.* 2010, Pérez-Ortega *et al.* 2010b, Printzen 2010, Lumbsch y Leavitt 2011).

Debido a la gran variación morfológica y plasticidad fenotípica de los taxones que conforman el grupo de *R. geographicum*, y a la dificultad, generalizada en líquenes crustáceos, para encontrar caracteres morfológicos válidos que delimiten las especies, se decidió seguir la línea de trabajo que trata de contrastar los caracteres morfológicos con los moleculares (Grube y Kroken 2000; Blanco 2004; Otálora 2008; Amo de Paz 2010; Leavitt *et al.* 2011; Lumbsch y Leavitt 2011; Truong 2012). La investigación de los caracteres moleculares, enfocados al subgénero *Rhizocarpon* y a nivel específico dentro del grupo de *R. geographicum*, es extremadamente escasa. Los pocos trabajos en los que se encuentran análisis moleculares de especies amarillas de *Rhizocarpon* son trabajos a cerca de otros grupos de líquenes, de flora o generales sobre grandes taxones (Grube *et al.* 2004; Miadlikowska *et al.* 2006; Kim *et al.* 2007; Schoch *et al.* 2009).

El trabajo más actual en el que se incluyen especies amarillas de *Rhizocarpon* es el de Ihlen y Ekman (2002), sobre el género *Rhizocarpon*, al que consideran polifilético. Esta conclusión general es obtenida del análisis de la evolución de 5 caracteres morfológicos (color de las ascóspora, septación de las ascóspora, reacción amiloide de la médula, presencia de sustancias pertenecientes al complejo del ácido estíctico y presencia de ácido rhizocárpico en el talo) que fueron evaluados sobre los árboles obtenidos por análisis bayesiano MCMC. La consideración del género *Rhizocarpon* como polifilético viene en primer lugar marcada por el hecho de que *R. hochstetteri* (Körb.) Vain. aparece en el mismo clado que *Poeltinula*, por lo que o bien se debería excluir del género *Rhizocarpon* a esta especie o bien habría que incluir a *Poeltinula* en el género y posiblemente también a *Catolechia*, a falta de incluir más datos moleculares que confirmen la posición de *R. hochstetteri*.

El análisis evolutivo de los 5 caracteres morfológicos que se investigaron en dicho trabajo, contrastado con los resultados del análisis de los datos moleculares, dieron las siguientes conclusiones generales:

La pigmentación amarilla del talo provocada por la presencia de ac. rhizocárpico, forma un clado monofilético en el que encontramos a *R. norvegicum*, *R. geographicum* (ambas especies pertenecientes al subgen. *Rhizocarpon*), *R. distincticum* y *R. polycarpum* (pertenecientes al subgen. *Phaeothallus*). Sin embargo el ácido está presente en *R. geographicum* y *R. norvegicum*, pero ausente en *R. distincticum* y *R. polycarpum*, lo que indica que la clasificación realizada por Thomson (1967) para diferenciar los dos subgéneros, *Phaeothallus* y *Rhizocarpon*, por la presencia o ausencia de ac. rhizocárpico, es artificial.

Por otro lado la septación de las ascósporas, tanto para aquellas con un septo como para aquellas con más de 3 septos, no forma clados monofiléticos y el carácter habría aparecido hasta 6 veces en la historia evolutiva del género (Ihlen y Ekman 2002). El color de las ascóspora ha sido considerado como un carácter importante en la separación de las especies del género *Rhizocarpon* (Timdal y Hartwig 1988, Fryday 1996). En este trabajo Ihlen y Ekman (2002) rechazan la monofilia para las especies con esporas hialinas como de las que poseen color, a este carácter se le suponía un valor significativo a la hora de delimitar los taxones a nivel de especie dentro del género (Fryday 2000), pero según Ihlen y Ekman (2002) tendría un valor mínimo: el color de las ascóspora probablemente haya cambiado hasta en 5 ocasiones en la evolución de las especies estudiadas del género *Rhizocarpon*.

Por último detectaron la presencia de sustancias pertenecientes al complejo del ac. estíctico en diferentes especies incluidas en el estudio, aunque estas no formaron un grupo monofilético en el análisis molecular. Así mismo, la reacción amiloide de la medula no se presenta en un grupo monofilético de especies. Ambos caracteres han cambiado en varias ocasiones en la evolución del género, por lo que no se pueden considerar como descriptivos a nivel específico.

En general, y a pesar de haber estudiado los caracteres más conservados dentro del género *Rhizocarpon*, se observó que la mayoría de ellos parecen haber cambiado más frecuentemente de lo que esperaban. (Ihlen y Ekman 2002).

Así, el trabajo de Ihlen y Ekman (2002) como la tesis doctoral de Clayden (2004) -que estudio desde una perspectiva morfológica y química las especies de *R. geographicum* s. lat. en el norte de Inglaterra-, son los precedentes más recientes en los que se ha basado el trabajo de tesis doctoral sobre el grupo de *R. geographicum* con la justificada novedad científica que este va a portar.

H.- Análisis de los Caracteres Moleculares del Fotobionte

Probablemente la simbiosis liquénica es una de las simbiosis más especializadas y con mayor diversidad morfológica y mayor amplitud ecológica del planeta, así presenta una distribución que abarca prácticamente todos los ecosistemas terrestres. El modo de propagación del líquen puede ser por reproducción sexual -la ascóspora encuentra un alga apropiada para realizar la simbiosis y germina (Ott 1987)- o por reproducción vegetativa a través de diásporas -isidios o soredios- conservando el alga del talo original y produciendo un nuevo individuo idéntico genéticamente al original del que provenía (Beck *et al.* 1998), aunque trabajos más recientes muestran que la diversidad genética de las algas está relacionada necesariamente con el modo de propagación del líquen (Wornik y Grube 2010). Por tanto en la reproducción sexual el fotobionte del talo original se sustituye por uno nuevo, accesible para la ascospora, lo que provoca diferentes combinaciones entre micobionte y fotobionte, haciendo que la diversidad genética aumente (Ohmura *et al.* 2006).

La identificación de las especies de fotobionte presentes en la simbiosis se ha realizado principalmente utilizando técnicas de cultivo celular, examen microscópico y datos de marcadores moleculares, en especial los procedentes de la secuenciación de genes codificantes nucleares. Son este último tipo de datos los que más luz han arrojado sobre el papel del fotobionte en la simbiosis líquénica (Beck *et al.* 1998; Kroken y Taylor 2000; Ohmura *et al.* 2006; Yahr *et al.* 2006; Pérez-Ortega *et al.* 2010a; del Campo *et al.* 2010; Casano *et al.* 2011).

Se hacen necesarios los estudios combinados sobre el micobionte y el fotobionte para intentar comprender la adaptación de los líquenes a diferentes condiciones ambientales así como por la posible influencia de las diferentes formas de crecimiento de los fotobiontes sobre la evolución en el crecimiento del talo líquénico (Grube y Hawksworth 2007).

El conocimiento actual sobre los fotobiontes que encontramos en las especies del grupo de *R. geographicum* es todavía escasa. Sabemos que se trata de algas del género *Trebouxia*, que por otro lado es el género más común de fotobiontes presentes en el 20% de las especies de líquenes (del Campo *et al.* 2010). Sin embargo desconocemos cuales son concretamente las especies de alga con las que el hongo sería capaz de realizar la simbiosis como también sus patrones filogeográficos o ecológicos dentro del grupo.

Por lo tanto, este será el primer estudio en el que se contrasten los resultados obtenidos del análisis combinado de varios genes del micobionte y del fotobionte, así como las posibles relaciones evolutivas y filo-geográficas entre ellos dentro del grupo de *R. geographicum*.

J.- Relevancia del estudio del grupo de *Rhizocarpon geographicum*

Desde que Linneo (1753) describiera al conocido líquen amarillo con el nombre de *Lichen geographicus*, por su similitud con un mapa imaginario dibujado sobre la roca, podemos decir que es uno de los líquenes más frecuentemente investigados y más fácilmente reconocible por los expertos y por el público en general, así como uno de los más difíciles si se trata de llegar a aproximaciones taxonómicas precisas.

Este hecho es admitido por todos los autores que lo han estudiado a lo largo de los años. En efecto, desde Runemark, quien aporta un amplio estudio taxonómico y ecológico para las especies amarillas del género *Rhizocarpon* pero que sin embargo no consigue resolver la taxonomía por completo por las dificultades que encuentra (Runemark 1956a y b), hasta Poelt, quien en una de las claves más modernas y completas para el subgen.

Rhizocarpon (Poelt 1988), advierte que en particular las especies de lo que él llama sección *Rhizocarpon* (grupo de *R. geographicum*) están insuficientemente clasificadas, debido a que los taxones son muy variables morfológicamente y por lo tanto el grupo debe ser estudiado más ampliamente.

Al consultar las diferentes claves, floras y guías de líquenes (Purvis *et al.* 1992; Brodo *et al.*, 2001; Øvstedal y Smith 2001; Barreno y Pérez-Ortega 2003; Llimona *et al.*, 2004; Nash *et al.* 2004) cualquier experimentado liquenólogo puede comprobar cómo queda patente que a pesar de tratarse de un grupo de líquenes fácilmente reconocible, *Rhizocarpon geographicum* s. lat. no está bien definido, debido fundamentalmente a la gran plasticidad fenotípica, a su elevada capacidad de adaptación a micro-hábitats y a su amplia distribución mundial. Todo lo cual ha conducido a los especialistas a la descripción de numerosas especies, subespecies y formas, no habiendo un claro consenso sobre el número de taxones reales que lo componen.

La resolución de este problema taxonómico ayudaría a perfeccionar las diferentes técnicas de distintas disciplinas científicas que utilizan las especies del grupo de *R. geographicum*:

Los líquenes son los primeros organismos pluricelulares en aparecer como colonizadores primarios de las rocas no calcáreas. La liquenometría se basa en el uso de líquenes, por ser organismos comunes sobre la superficie de la Tierra y con un amplio rango ambiental, para obtener una datación aproximada de la deposición de la superficie sobre la que se encuentran. Entre las ventajas de este “medidor de tiempo” se incluyen la capacidad de datación de superficies de hasta 500 años. Téngase en cuenta que en este intervalo de tiempo la datación por radiocarbono es menos eficiente, menos precisa, más lenta y más cara (Armstrong 2004).

Así, la liquenometría ha sido usada en diferentes contextos, siendo el principal la datación de las morrenas glaciares (Innes 1981; Proctor 1983; Sancho y Valladares 1993; Caseldine y Baker 1998; Sancho *et al.* 2011), particularmente, las especies del grupo de *R. geographicum*, que comprende organismos que actúan como colonizadores primarios, debido a las distintas particularidades que los definen, como poseer un crecimiento muy lento, 0.02 - 2 mm año⁻¹ (Halle 1983; Armstrong 1983; Innes 1985; Sancho *et al.* 2007a). Dichas tasa de crecimiento fuertemente relacionadas con las condiciones climáticas de cada zona y siendo mayores en los lugares más oceánicos (Sancho y Pintado 2004). Además de tener una amplia distribución geográfica -es posible encontrarlos en medios extremadamente hostiles para la

vida como las zonas polares o alpinas y en áreas recientemente deglaciadas (Proctor 1983; Sancho y Valladares 1993; Winchester y Chaujar 2002) y ser muy longevos (Armstrong 2004).

En las últimas décadas las especies amarillas del género *Rhizocarpon* han sido utilizadas para la datación de superficies, en estudios de retroceso glaciar y en la mayoría de los estudios de liquenometría (Porter 1981; Armstrong 1983; Armstrong y Smith 1987; Benedict 1988; Innes 1986; Sancho y Pintado 2004; Bradwell y Armstrong 2007; Sancho *et al.* 2007a; Zhu y Yu 2007; Jomelli *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2011). También en la datación de eventos sísmicos (Bull y Brandon 1998) y de restos arqueológicos (Winchester 1988; Romas y Rattazzi 1996; Bradwell 2010; Nimis *et al.* 2002). Por ejemplo, Jomelli *et al.* (2008) trabajaron sobre 123 morrenas asociadas a 24 glaciares de la Cordillera Blanca en Perú, las medidas realizadas sobre talos de *Rhizocarpon* amarillos revelaron la existencia del avance de los glaciares en el inicio del último milenio, aunque la máxima extensión glaciar de la Pequeña Edad de Hielo finalizaría algunos siglos más tarde, alrededor del 1630 AD. Desde esta máxima extensión, los glaciares que estudiaron se han ido retirando, debidos probablemente a que los glaciares tropicales son mucho más sensibles al cambio climático y por tanto una disminución en las precipitaciones en combinación con cambios en la duración de la temporada de lluvias o en la nubosidad lo explicaría.

Por otro lado, las diferentes especies amarillas de *Rhizocarpon* pueden colonizar una superficie a ritmos diferentes, debido probablemente a los diferentes procesos de desarrollo del talo liquénico, e.g., las especies del grupo de *R. geographicum* pueden colonizar antes una superficie que *R. alpicola* (del grupo *Alpicola*) (Armstrong 2004), por lo que es extremadamente importante fijar cuántas y cuáles son las especies que quedarían dentro del grupo.

En los estudios de biodeterioro, sobre restos arqueológicos graníticos, *Rhizocarpon geographicum* s. lat. junto con otras especies de líquenes pioneros, es siempre tenido en cuenta por su acción pedogenética y su presencia frecuente (Winchester 1988; Romas y Rattazzi 1996; Bradwell 2010; Nimis *et al.* 2000).

Otros experimentos científicos de interés han utilizado muestras de *R. geographicum* s. lat., este es el caso por ejemplo de los experimentos sobre la calidad del aire (Jiries *et al.* 2008) midiendo la concentración de metales pesados sobre los talos de individuos del grupo, o los llevados a cabo en la Agencia Espacial Europea en los que se simulaban condiciones espaciales demostraron la elevada capacidad de resistencia de *R. geographicum* s. lat. (De la Torre *et al.* 2007). Más tarde esta capacidad sería confirmada tras la puesta en órbita en la cápsula Biopan V en la que varios especímenes fueron expuestos a condiciones espaciales reales y, al ser recogida de nuevo la cápsula, mostraron una rápida y elevada recuperación de su actividad biológica (De la Torre *et al.* 2007; Sancho *et al.* 2007b; De los Ríos *et al.* 2010).

Con respecto a la **fisiología del grupo**, los distintos estudios se han centrado en las medidas sobre la fluorescencia de la clorofila *a*, confirmando la gran resistencia de las especies y subespecies del grupo a ambientes extremos (Heber *et al.* 2000; Sancho *et al.* 2007b; De la Torre *et al.* 2010). La tesis doctoral de Raggio (2013) estudió exhaustivamente distintas variables fisiológicas -fotosíntesis neta y bruta, respiración y Fv/Fm- respecto a los tamaños de distintos talos de individuos del subgen. *Rhizocarpon*, así como posibles diferencias metabólicas entre el centro y la periferia de los talos. Concluyéndose que no existe relación definida entre los tamaños del talo y la fotosíntesis; no se encontraron diferencias significativas entre el centro y la periferia del talo tanto para la clorofila como para el estado fisiológico del fotosistema II, siendo la fotosíntesis neta y el Fv/Fm uniformes a lo largo de la vida de los talos del subgen. *Rhizocarpon* estudiados. Además, los resultados de este novedoso trabajo junto con estudios anteriores (Bench *et al.* 2001; Armstrong y Bradwell 2010), sugieren que la morfología de las especies y subespecies del subgen. *Rhizocarpon* condicionan un crecimiento distinto basado en un reciclaje activo de las areolas del talo.

OBJETIVOS

AIMS

A.- Justificación de la Tesis

La mayoría de los autores (Räsänen 1949a; Runemark 1956a y b; Thomson 1967; Poelt 1988; Clayden 2004), están de acuerdo en la gran plasticidad fenotípica de los individuos que componen el grupo de *Rhizocarpon geographicum*. La totalidad de dichos autores, basándose en el estudio combinado de los diferentes caracteres anatómicos y químicos, unido a que la localización de dichos trabajos abarcan zonas geográficas relativamente restringidas (a excepción de los trabajos monográficos de Runemark 1956a y b que es a nivel europeo), adoptaron criterios segregacionistas proponiendo una serie de especies, subespecies y formas, sin llegar a un claro consenso en el número final de taxones atribuibles al grupo de *Rhizocarpon geographicum*.

Puesto que hasta el momento el estudio del grupo se ha basado tradicionalmente en la observación de los caracteres morfológicos y químicos del talo liquénico, sin que estos hayan aclarado la variación inter e intra-específica del complejo (Purvis *et al.* 1992; Wirth 1995). Por tanto, se hace necesario el uso de una estrategia doble aunando la taxonomía tradicional con el uso de técnicas moleculares. Así pues, en este trabajo se estudiará la anatomía y la química del talo liquénico y se analizará la filogenia molecular de ambos simbiontes. El estudio se ha planteado a dos niveles geográficos realizando una primera aproximación restringida y más precisa en las principales cordilleras de la Península Ibérica y una segunda aproximación a nivel mundial.

Puesto que hasta el momento el estudio del grupo se ha basado tradicionalmente en la observación de los caracteres morfológicos y químicos del talo liquénico, se hace necesario el uso de una estrategia doble aunando la taxonomía tradicional con el uso de técnicas moleculares.

B.- Objetivos Principales y Estructura de la Tesis

- 1) Revisión de las especies tipo del grupo y comparación con las descripción de la especie y las claves de identificación usadas habitualmente para los individuos del grupo (Capítulo1).

- 2) Analizar el valor taxonómico de los caracteres anatómicos y químicos que se han utilizado tradicionalmente en el estudio del grupo de *Rhizocarpon geographicum*: caracteres macro-morfológicos, micro-morfológicos e identificación los principales metabolitos secundarios de dichos líquenes usando la Cromatografía en capa fina (TLC).

- 3) Se trata de contrastar la información obtenida por el estudio de los caracteres morfológicos con la información que puede aportar el estudio filogenético basado en los caracteres moleculares, para detectar así una posible correlación entre ambos tipos de caracteres. El propósito básico consiste en tratar de constatar si los linajes filogenéticos reconocidos en el análisis molecular pueden ser asociados con otras propiedades (caracteres fenotípicos o corológicos). Asimismo la consideración recíproca: constatar si las especies definidas por sus rasgos taxonómicos clásicos se agrupan en linajes naturales o filogenéticos.

El Capítulo 2 y el Capítulo 3 se centran en la resolución de estos dos primeros objetivos analizando y evaluando los caracteres morfo-químicos usados por los distintos especialistas para la división taxonómica del grupo, esclareciendo las relaciones filogenéticas entre las especies y subespecies del grupo y confrontando estas con los caracteres morfo-químicos. Ambos capítulos se centraron en la Península Ibérica como área de estudio por contener una elevada variabilidad en especies y subespecies del grupo.

4) Estudio molecular del fotobionte, *Trebouxia* sp., presente en el grupo de *Rhizocarpon geographicum*, realizando dos aproximaciones; la primera en una escala más restringida con individuos procedentes de la Península Ibérica intentando aportar información extra al estudio del complejo en esta zona. Otra en una escala más amplia con muestras recolectadas en distintos puntos del planeta. En ambos casos se compararán las relaciones entre foto y micobionte; se establecerán las posibles relaciones de selectividad, se comprobará una posible co-evolución entre ambos simbioses y se detectará si existe una correlación geográfica y/o ecológica en la simbiosis liquénica producida en el grupo (Capítulo 4).

5) Analizar la biogeografía y la bipolaridad de las especies del grupo de *Rhizocarpon geographicum*: análisis del comportamiento morfológico del grupo a escala mundial contrastándolo con su bipolaridad y con posibles patrones de distribución geográfica. Se establecerán las relaciones entre los distintos grupos monofiléticos obtenidos dentro del complejo, conformando así la filogenia del grupo a nivel mundial (Capítulo 5).

Para alcanzar los objetivos propuestos se propone una investigación en profundidad de los caracteres morfológicos y químicos del grupo así como el análisis del mayor número posible de caracteres moleculares para ambos simbioses.

Finalmente se discutirán los resultados obtenidos en cada uno de los estudios realizados, se aportarán las conclusiones alcanzadas en el trabajo y que contribuirán a un nuevo entendimiento del grupo de *R. geographicum* y del subgénero *Rhizocarpon*.

METODOLOGÍA GENERAL

GENERAL METHODOLOGY

A.- Material biológico

En total se han analizado 237 especímenes de hongos liquenizados pertenecientes a 28 especies de las cuales 17 pertenecen al grupo de *R. geographicum*, y 11 especies a los otros 3 grupos del subgen. *Rhizocarpon* (*Superficiale*, *Viridiatrum* y *Alpicola*). El material utilizado fue siempre fresco, menos de 3 años de recolección. Se recomienda realizar trabajos de taxonomía con materiales frescos (Baral 1992), ya que los materiales de herbario pueden dar problemas en algunos de los caracteres anatómicos que se han observado. Todas las muestras fueron recolectadas directamente en el campo e incluidas en el herbario MAF de la Facultad de Farmacia de la UCM. Las especies del grupo de *R. geographicum* estudiadas se muestran en el Capítulo 1, en la Tabla 2.2 del Capítulo 2 y en el apartado A del Apéndice 5, indicando su localidad, recolector y código de herbario. Los materiales se conservaron desecando a temperatura ambiente hasta su posterior utilización.

La determinación de cada uno de los ejemplares se realizó utilizando obras especializadas como la monografía sobre el subgénero *Rhizocarpon* de Runemark (1956a) y las clave de Poelt (1988). Adicionalmente, se usaron otras obras y claves como los trabajos de Räsänen (1942b, 1944, 1949a), Thomson (1967), Feuerer (1978) y Timdal (1988).

En el Capítulo 1 se dan las descripciones de las especies y subespecies del grupo estudiadas según los diferentes autores que las describieron y se muestran fotografías de las especies tipo, realizándose una revisión de cada una y comparándola con las observaciones de materiales propios (Capítulo 1 y 5). Así mismo, el apartado Material y Métodos sección Análisis morfológico y químico, del Capítulo 2, en el que se detalla el estudio macro y micro-morfológico y químico de los individuos del grupo de *R. geographicum*.

Todas las fotografías tomadas de los talos y de las ascósporas de los individuos estudiados son propias, salvo en los casos en los que se ha indicado lo contrario. Fueron realizadas bajo la lupa binocular Nikon SMZ-2T y con la cámara Nikon DS-Fi1 y bajo el microscopio óptico, Nikon Eclipse 80i y con la cámara Nikon DS-Fi1 ambos en el Departamento de Biología Vegetal II de la UCM.

B.- Método de extracción de ADN

La preparación de las muestras se realizó tomando areolas limpias de impurezas visibles bajo observación a la lupa binocular Nikon SMZ-445 con la ayuda de pinzas de disección y pincel. Se depositaron aproximadamente 5 mg en peso seco (entre 5 y 10 areolas) de cada individuo en tubos de microcentrífuga individuales estériles de 1,5 ml de volumen. Los tubos de microcentrífuga fueron depositados en nitrógeno líquido alrededor de 5 minutos para asegurar la congelación de las muestras, lo que facilita su posterior disgregación. Usando estos como morteros y con la ayuda de varillas estériles se realizó el machacado del material hasta reducirlo a polvo.

La extracción del ADN genómico se hizo usando el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen®, con algunas modificaciones para material liquénico previamente descritas (Crespo *et al.* 2001; Blanco 2004). El protocolo de Qiagen descrito en los trabajos mencionados, fue modificado en el último paso ajustándolo para la extracción de ADN de los especímenes del grupo de *R. geographicum*, para conseguir una mayor concentración de ADN, en proporción nmol/ μ l, y obtener mejores rendimientos en la amplificación de los segmentos de ADN y en su posterior secuenciación: en el paso final de la extracción de ADN, la columna de extracción fue colocada sobre un tubo de microcentrífuga limpio y estéril, sobre dicha columna se añadió un volumen de 40 μ l de tampón AE precalentado a 65° C. Los tubos se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 25° C), se centrifugaron pasado este tiempo a 11000 rpm durante 2 minutos. Se volvió a repetir este último paso, volviendo a poner sobre la columna 40 μ l de tampón AE precalentado e incubando de nuevo a temperatura ambiente. Se recuperó un volumen final de extracto de ADN de 80 μ l, que se almacenó hasta su utilización a -20° C.

C.- *Loci* utilizados, amplificación de las secuencias de ADN y condiciones de PCR

Loci utilizados

La gran variabilidad del fragmento del Segmento Transcrito Interno del ADN ribosómico nuclear -ITS nu-, ha hecho que sea la región más usada para la delimitación de especies, así como su uso conjunto con las regiones LSU nuclear y SSU mitocondrial en trabajos a niveles taxonómicos más elevados (Crespo y Cubero 1998; Blanco *et al.* 2004; Muggia *et al.* 2008; Crespo *et al.* 2010a; Pérez-Ortega *et al.* 2010b, Schoch *et al.* 2012), por lo que fue la región seleccionada para la realización de los análisis moleculares inter e infra-específicos dentro del grupo de *R. geographicum*.

Para el micobionte, se utilizaron los *primers* ITS 1F (Gardes y Bruns 1993), ITS 1LM (Myllys *et al.* 1999) e ITS 2KL (Lohtander *et al.* 1998) -*primers* internos de la región de ITS nu- (Tabla 2 y Fig. 9). Como *primer* reverso se utilizó el *primer* universal LR1 (Vilgalys y Hester 1990) ya que tras diversos ensayos con diferentes combinaciones de *primers*, ajustes de temperatura y tiempos de la PCR, se comprobó que su uso combinado con el *primer* directo ITS 1F proporcionaba mejor rendimiento en la PCR así como mejor calidad de las secuencias -Tabla 3 y Fig. 10-.



Figura 9.- Posición relativa de los *loci* utilizados para la región ITS del ADN ribosómico nuclear. (Fuente: Blanco 2004).

Se analizó también para el micobionte la región codificante para la subunidad grande del ADN ribosómico mitocondrial -LSU mt- por su probada utilidad en el estudio de variabilidad infraespecífica en diversos grupos de líquenes (Zoller *et al.* 1999; Printzen 2002; Ott *et al.* 2004; Ferencova *et al.* 2010; Núñez-Zapata *et al.* 2011).

Se probaron los *primers* LSU mt específicos para hongos ML4-ML3 (Printzen 2002), pero debido a la poca eficiencia que mostro este par de *primers* en la amplificación de los segmentos de ADN de las muestras del grupo de *R. geographicum*, se diseñó el par de *primers* específicos para dichas especies **Rg-mtLSU F-R** (F: *primer* directo, R: *primer* reverso) -Fig. 10- con los que se obtuvieron secuencias parciales de la región LSU mt.

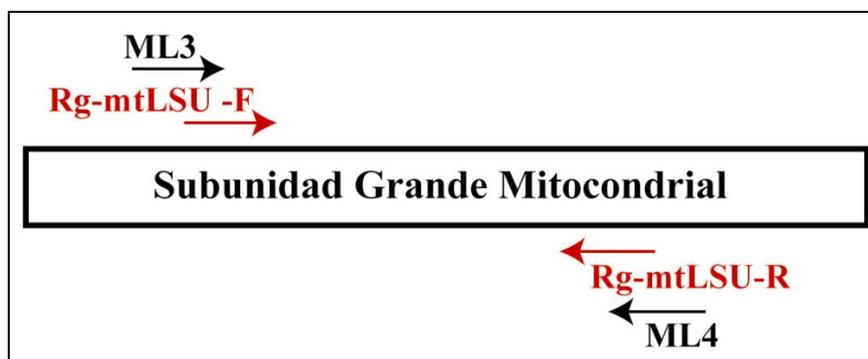


Figura 10.- Posición relativa de los loci utilizados para la región LSU del ADN ribosómico mitocondrial. En rojo se indica la posición relativa de los *primers* diseñados para *Rhizocarpon geographicum* s. lat.

El diseño del *primer* se realizó utilizando como secuencias de referencia 4 secuencias de subgen. *Rhizocarpon* obtenidas previamente usando el par de *primers* ML4-ML3, y 5 secuencias del LSU mt de otros géneros disponibles en el Genbank (Tabla 2).

Tabla 2.- Secuencias de referencia para el diseño del <i>primer</i> Rg-mtLSU F-R.			
	Especie	Cód. Herbario	Nº GenBank
subgen. <i>Rhizocarpon</i>	<i>R. macrosporum</i>	MAF-16635	---
	<i>R. sublucidum</i>	MAF-16645	---
	<i>R. geographicum</i> subsp.	MAF-16659	---
	<i>prospectans</i>		
	<i>R. viridiatrum</i>	MAF-17050	
Otros grupos.	<i>Biatora pycnidiata</i>	Printzen 5497	AF411427
	<i>Biatora toensbergii</i>	---	AF411421
	<i>Cavernularia hultenii</i>	McCune 25316	AF411419
	<i>Lecanora fuegiensis</i>	---	AY048998
	<i>Psora icterica</i>	Timdal US 211/01 (O)	EF521300

Del alineamiento de estas 9 secuencias -Fig. 11- y comparando las regiones conservadas con los resultados obtenidos a través del programa *Primer 3* (Rozen y Skaletsky 2000), se obtuvo el par de *primers* específicos:

- Rg-mtLSU-F: 5'- ATAGTACGATAAGGTTGTATGTCTA -3', con una longitud de 25 pb y una temperatura de *annealing* de 51,43 °C.
- Rg-mtLSU-R: 5'- GCCTTCGTATWCTCTACTTGC -3', con una longitud de 23 pb y una temperatura de *annealing* de 58,33 °C.

La longitud total de la secuencia, incluyendo la región del *primer*, sería de 1293 pb, obteniendo un amplificado de aproximadamente 918 pb.

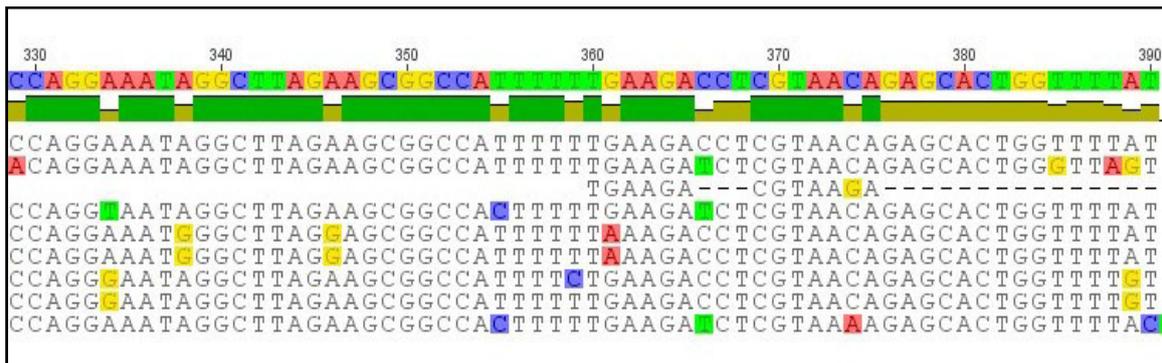


Figura 11.- Parte del alineamiento completo de 4 secuencias de *Rhizocarpon* sp. y 5 secuencias de otros grupos. Longitud total del alineamiento 1426 pb.

Amplificación de las secuencias de ADN y Condiciones de PCR

La amplificación para las muestras tanto del micobionte como del fotobionte se llevó a cabo utilizando el kit comercial PuReTaq™ Ready-to-Go PCR Beads (GE Healthcare), en los que se da preparada la mezcla de reacción, que contiene: Estabilizadores (BSA, dATP, dCTP, dGTP, dTTP), aproximadamente 2.5 unidades de puReTaq ADN polimerasa y buffer, para un volumen final de 25 µl, con una concentración en dNTPs de 200 µM en 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl y 1.5 mM de Mg Cl₂, debiendo añadir únicamente 21,5 µl de H₂O miliQ, 1,25 µl (10 µM) de cada *primer* utilizado y 1 µl de extracto de ADN de cada muestra sin diluir, en tubos de PCR individuales.

Dependiendo de la concentración de ADN obtenida de la extracción se varió dichas proporciones para obtener mayor rendimiento de la PCR, así para algunas muestras se agregaron 2 µl de ADN, 1,5 µl (10 µM) de cada *primer* y 20 µl de H₂O para un volumen final de 25 µl.

Las amplificaciones para las dos regiones principales utilizadas para el micobionte - ITS nu y LSU mt- fueron realizadas en un termociclador automático MJ Research modelo PTC-100 y en las siguientes condiciones de PCR -Tabla 3-:

Tabla 3.- Condiciones de PCR para los loci de ITS nu y LSU mt.

Segmento Amplificado	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos-segundos)	Ciclos
ITS nu (ITS 1F, ITS 1LM, ITS 2KL y LR1)	94 °C	5 min.	1
	94 °C	1 min.	
	56 °C	1 min.	30
	72 °C	1 min. 30 seg	
	72 °C	10 min.	1
LSU mt (Rg-mtLSU F-R)	95 °C	30 seg	
	68 °C	30 seg	3
	72 °C	1 min.	
	95 °C	30 seg	
	65 °C	30 seg	3
	72 °C	1 min.	
	95 °C	30 seg	
	60 °C	30 seg	4
	72 °C	1 min.	
	95 °C	30 seg	
	55 °C	30 seg	30
	72 °C	1 min.	

La visualización de los productos resultantes de la amplificación de la PCR para micobionte y fotobionte se determinó mediante electroforesis a 90 voltios, utilizando geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE (Sambrook *et al.* 1989) al que se le añadía 5 µl de SYBR Safe DNA gel stain 10000 X concentrado en DMSO (Invitrogen) por cada 100 ml de tampón TAE. En cada pocillo del gel se adicionó 4 µl de producto de PCR de cada una de las muestras y en el último pocillo 4 µl de patrón de peso molecular (Bio-Rad Amplisize Molecular Ruler 50-2000 pb) para estimar la concentración de ADN amplificado. Para poder visualizar los geles se introdujeron en un transiluminador de luz UV BIOVISION Modelo 1000/26M (VisionCapt, Vilber Lourmat).

D.- Purificación y secuenciación de los productos de PCR

La purificación de los productos resultantes de la amplificación por PCR se realizó utilizando el kit comercial de Enzimas Illustra ExoSAP-ITTM PCR Clean Up (GE Healthcare), el proceso consiste básicamente en eliminar los restos de los productos de reacción de la PCR por digestión enzimática. El protocolo seguido fue el recomendado por la casa con alguna modificación: de cada producto de PCR se tomaron 12 µl y se llevaron a tubos de microcentrífuga estériles de 0,2 ml a los que se les añadió 2 µl de enzimas ExoSAP. Los tubos de microcentrífuga con la mezcla de producto de PCR y enzima fueron llevados a un termociclador automático MJ Research modelo PTC-100, donde fueron sometidos a diferentes temperaturas como se detalla en la tabla siguiente:

Tabla 4.- Condiciones de Purificación con enzima Exo-Sap.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
37 °C	15 min.	1
80 °C	30 min.	1
4 °C	≈ 15 min (Enfriar)	1

Los productos purificados, con una concentración entre 10-20 ng/μl se secuenciaron en el Centro de Genómica (Parque Científico de Madrid, de la Universidad Complutense de Madrid) para la mayoría de las secuencias de ITS nu y en el Servicio de Secuenciación de MacroGen Inc., Europa (Ámsterdam, Holanda) se realizó la secuenciación completa del LSU mt y parte de las secuencias para el ITS nu.

La secuenciación en el Centro de Genómica de la UCM se realizó utilizando el Kit de Reacción ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Ready (Applied Biosystems) con los mismos *primers* empleados en las reacciones de PCR, que en este caso serían los *primers* internos ITS 1LM e ITS 2KL, secuenciados en ambas direcciones con el fin de obtener secuencias más largas, más fiables y para minimizar posibles errores derivados del proceso de secuenciación. La reacción de secuenciación fue realizada en el secuenciador automático de ADN 3730 (Applied Biosystem).

Para la secuenciación completa del LSU mt y de 1/3 de las secuencias de ITS nu realizada en MacroGen Inc. Europa se utilizó el Kit de secuenciación BigDye™ Terminator 3.1 con el polímero Pop 7 Polymer®, empleando los mismos *primers* utilizados en la reacción de PCR Rg-mtLSU-F, Rg-mtLSU-R e ITS 1F y LR1, secuenciando ambas direcciones cuando la secuencias eran poco fiables o más cortas de lo esperado. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en el secuenciador automático 37XL Applied Biosystems.

Todas las secuencias obtenidas fueron comprobadas en la base de datos Blast del NCBI para evitar posibles errores y asegurar la correcta amplificación tanto del taxón como del *primer* utilizado.

Las especificaciones de *primers* utilizados, amplificación, purificación y secuenciación de ADN de otras regiones para el micobionte así como para las especificaciones utilizadas para el fotobionte se detallan en los apartados de Material y Métodos de los Capítulos 3 y 4.

E.- Alineamiento de secuencias, modelos evolutivos de sustitución de nucleótidos y análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas tanto para las regiones ITS nu y LSU mt como para las regiones ITS nu y *rbcLX* del alga, en dirección 5'→3' como 3'→5' fueron revisadas y ensambladas con el programa Seqman II v. 5.07 (DNASTAR Inc.) y en el programa Geneious Pro v. 5.3.6 (Drummond *et al.* 2010), de donde se obtuvieron matrices separadas para cada uno de los genes utilizados que fueron alineadas usando el programa de alineamiento Muscle v. 3.6 (Edgar 2004).

Las regiones ambiguas fueron eliminadas de todos los alineamientos utilizando el software Gblocks 0.91b (Castresana 2000), en el que todos los parámetros se establecieron para ajustarse a un mínimo de restricciones y permitiendo la aparición de regiones con huecos (*gaps*) tan sólo a la mitad.

En el caso del marcador molecular Rg-mtLSU F-R, las regiones que no se pudieron alinear de forma no ambigua, principalmente a partir de la posición 400 del alineamiento de la región, fueron excluidas del alineamiento final y por tanto, de los análisis filogenéticos (Ott *et al.* 2004).

Los modelos evolutivos de sustitución nucleotídica que se emplearon en los análisis filogenéticos, fueron inferidos para cada uno de los genes utilizados con el programa jModelTest v. 0.1.1 (Posada 2008), en el que se introdujeron las matrices de cada gen por separado, corriendo un total de 88 modelos y optimizado por ML, el criterio elegido fue el de Akaike Information Criterion -AIC- (Akaike 1974) en todos los casos.

Para los análisis de estimación de las relaciones filogenéticas se ha utilizado como análisis principal la **inferencia Bayesiana**, que es similar a los análisis de *maximum likelihood* (ML) con la diferencia de que los análisis bayesianos buscan el mejor conjunto de árboles que expliquen los datos y el modelo evolutivo que se está analizando, en lugar de buscar el árbol más probable como ocurre en los análisis de ML (Hall 2008). La inferencia bayesiana muestrea un conjunto de árboles con elevadas probabilidades a partir de los datos y valora las características en común entre estos árboles dando un árbol consenso final.

Se basa en la noción de las probabilidades posteriores, probabilidades que son estimadas para cada clado como la suma de las probabilidades posteriores (pp) de todos los árboles que contienen dicho clado, **siendo significativo los valores ≥ 0.95 de pp**, obteniéndose así un árbol filogenético 50% *Majority Rule*. Para el análisis Bayesiano se utilizó el programa Mr. Bayes v. 3. 1.2 (Huelsenbeck y Ronquist 2003) que utiliza el método *Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo* (MC)³: este tipo de análisis es complejo y necesita de bastante tiempo debido fundamentalmente a que requiere un modelo evolutivo, sin embargo la mayor ventaja es que maximiza las probabilidades de obtener un árbol consenso que contemple todas las posibilidades para nuestro set de datos y el modelo evolutivo seleccionado, generando un árbol consenso 50% *majority-rule* que será el que ilustre los análisis filogenéticos realizados. La frecuencia de base, los valores de *likelihood* (Ln *likelihood*) y de la longitud total del árbol (TL *total tree length*) se tomaron revisando los archivos generados en Mr. Bayes con el programa Tracer v. 1.5.

Con el fin de comparar, corroborar, y garantizar la fiabilidad de los resultados, se utilizaron análisis de **Máxima Parsimonia, MP**. La MP se basa en la suposición de que el árbol más probable es el que requiere el menor número de cambios evolutivos para explicar la matriz de datos, análisis que se llevaron a cabo usando el programa PAUP* v. 4.0b.10 (Swofford 2003), realizando búsquedas heurísticas y análisis del Bootstrap (Felsenstein 1985) admitiendo como consenso que éste es **significativo cuando dicho valor es $\geq 70\%$** . La búsqueda heurística se llevó a cabo realizando 1000 repeticiones al azar y teniendo en cuenta para el algoritmo de intercambio entre ramas la reconexión de árboles bi-seccionados *-tree-bisection-reconnection* (TBR)- para el intercambio de ramas y la opción de múltiples-árboles *-MulTrees-*, los caracteres (bases nitrogenadas) fueron considerados con el mismo peso y los huecos *-gap?* se trataron como datos perdidos. El análisis de bootstrap fue realizado en base a 1000 pseudo-replicas.

Los árboles filogenéticos fueron editados utilizando el programa Treeview (Page 1997), Fig Tree v. 1.3.1 (Rambaut 2007) y Corel Draw v. 6x.

En todos los análisis filogenéticos del hongo se utilizó como grupos externos (*outgroup*) la especie *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. junto con 1 taxón de *Parmelina tiliacea* (Hoffm.) Hale ambas especies del orden *Lecanorales*.

Según Miadlikowska *et al.* (2006) el grupo hermano de familia *Rhizocarpaceae* es *Catillariaceae*, pero las pruebas realizadas con individuos de dicha familia y del orden Lecanorales como por ejemplo *Umbilicaria nylanderiana* (Zahlbru.) H. Magn. o *Japewia tornoënsis* (Nyl.) Tønsberg, se descartaron para su uso como *outgroup* por obtener resultados muy similares y tener más disponibilidad de material fresco de las especies que finalmente se utilizaron.

Mientras que en los análisis del alga se utilizó las secuencias de *Trebouxia gelatinosa* Ahmadjian ex Archibald como se indica oportunamente en el Capítulo 4 -Tabla 4.2-. Así mismo se incluyeron por lo general en todos los análisis individuos de otros grupos del subgen. *Rhizocarpon* con el fin de encontrar las posibles relaciones filogenéticas con el grupo de *R. geographicum* según se detallará en cada capítulo.

Tabla 5.- Grupos externos utilizados para el estudio del hongo en <i>Rhizocarpon geographicum</i> s. lat.			
Especie	Cód. Herbario	Nº Acceso GenBank	
		ITS nu	LSU mt
<i>Cetraria aculeata</i> (Schreb.) Fr.	---	GQ375372	HM573615
<i>Parmelina tiliaceae</i> (Hoffm.) Hale	MAF-16452	JF756979	JF757028

En el apartado Material y Métodos de los Capítulos 2, 3, 4 y 5 se especifican con mayor detalle las características de los alineamientos, modelos evolutivos de sustitución nucleotídica seleccionados y parámetros de los análisis filogenéticos utilizados, así como otras especificaciones metodológicas.

Todas las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del Genbank para su consulta. La correspondencia entre los números de acceso del Genbank y los números de MAF para cada secuencia se proporcionan en el Apéndice 1.

**CAPÍTULO 1: Descripción detallada de las especies y
revisión de las especies tipo
del grupo de *Rhizocarpon geographicum***

**CHAPTER 1: Species description and type species revision
in the
Rhizocarpon geographicum group**



ABSTRACT

INTRODUCTION

We provide here the original description for every species studied; a revision of the type species and a list of our own materials for each species studied. Based on the types' observation and the original descriptions we selected morphological characters to consider.

In every species description the basionym and type from original collections have been indicated. We don't include the synonyms of each species. Publication's names have been allocated based on *Botanico-Periodicum-Huntianum* (B-P-H).

We have included our own photographs from type specimens thalli and ascospores and from our own materials. Accordingly with the highly variable species and subspecies included in the group, revisions of the original descriptions and type species are very necessary.

MATERIAL AND METHODS

We studied the type specimens from 14 species. It was not possible to revise the types of *Lichen geographicus* L. -type of *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. ssp. *geographicum*- *Lecidea nidifica* Hue -type of *Rhizocarpon nidificum* (Hue) Darb.- and *Lecidea tinei* Tornab. -type of *Rhizocarpon tinei* (Tornab.) Runem.-. Specimens of *Lichen geographicus* L. doesn't exist in the Linnean Herbarium. *Lecidea nidifica* Hue and *Lecidea tinei* Tornab. were not provided by the herbaria.

The type specimens were manipulated according to conservation requirements indicated by the herbaria. We have taken different measures from thalli: areoles convex or plane (FAr), areoles collarlike (Coll), diameter of areoles (DAr) and apothecia (DAp). From ascospores: number of cells in the ascospores (CSp), ascospores length (LgSp) and width (AnSp). From chemistry: epihyemium reaction to KOH and medulla reaction to Pd and I. Pd medulla reaction has been only observed in type specimens which were necessary to identify, according to dichotomous keys, as *R. lecanorinum*, *R. drepanodes* and *R. ferax*. We didn't consider colour of the thalli because the type specimens are very old (more than 30 years) and colours could be degraded. A total of 10 characters were studied -Table 1.1-.

The measures were made according to the specifications outlined in the General Methodology and the Materials and Methods section of Chapter 2.

RESULTS AND DISCUSSION

The high phenotypic variability observed in the type specimens caused in some cases inconsistencies with original descriptions and with keys used to identify the species and subspecies in the group.

Chemical reactions could be unreliable and inconsistent according with our observation among type specimens, original descriptions and modern keys, e.g.: Pd medulla reactions colours on *R. lecanorinum*, *R. drepanodes* or *R. ferax* were very subjective and epihymenium reaction to KOH in type specimen of *R. prospectans* was negative, but in dichotomous keys appears only +. On the other hand, areoles collarlike, one of more important characters in the species description, are present in more species that the keys and monographs indicated.

Consequently, a depth analysis of these characters and others, and the comparison with the phylogeny of the group appears absolutely necessary. It will be discussed in following chapters (Chapters 2 and 5).

INTRODUCCIÓN

A continuación se proporcionan las descripciones de todas las especies y subespecies de *R. geographicum* s. lat. que se incluyen en este trabajo, según cada uno de los autores que las describieron, se indican los materiales propios estudiados para cada una de las especies y subespecies de *R. geographicum* s. lat. y la revisión de las especies tipo.

En cada una de las descripciones, se indica el basiónimo de la especie y el pliego tipo de la colección original del mismo, los materiales que se estudiaron de cada una de ellas y fotografías de los talos y de las ascósporas, tanto de los especímenes tipo revisados como fotografías de los materiales propios estudiados. No se incluyen los sinónimos que pueden ser consultados en las monografías (Anders 1923; Räsänen 1942a y b, 1943b, 1944, 1947, 1949b; Runemark 1956a; Feuerer 1978 etc.) y que deben ser añadidos a los basiónimos dados. Los nombres de las publicaciones se han consignado en base al *Botanico-Periodicum-Huntianum* (B-P-H) (Lawrence *et al.* 1968).

Las descripciones originales así como la revisión de las especies tipo se incluyen con el fin de facilitar la comprensión del concepto morfológico utilizado de las distintas especies del grupo y el valor diagnóstico de los caracteres anatómicos empleados tradicionalmente en el estudio de *R. geographicum* s. lat., sobre todo en lo referente a la descripción de los talos y la caracterización de las ascósporas. En base a estas descripciones se seleccionaron los caracteres anatómicos y químicos más importantes a estudiar y evaluar en nuestro estudio (Capítulo 2 y 5).

Además, la comparación de las descripciones originales con las especies tipo dadas por los distintos autores mostrarán la congruencia o la falta de ella entre las descripciones y los materiales (Capítulo 5).

MATERIAL Y MÉTODOS

De los 17 taxones de *R. geographicum* s. lat. incluidos en el estudio, se han podido revisar los tipos de 14. Las tres que faltan son *Lichen geographicus* L. -especie tipo de *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. subsp. *geographicum*- *Lecidea nidifica* Hue -especie tipo de *Rhizocarpon nidificum* (Hue) Darb.- y *Lecidea tinei* Tornab. -especie tipo de *Rhizocarpon tinei* (Tornab.) Runem.- estos dos últimos tipos no fueron prestados por los herbarios donde se conservan. Con respecto a *Lichen geographicus* L. no existen especímenes tipo en el Herbario de Linneo como comprobamos en la última consulta realizada en la digitalización del herbario (11.02.2013). Linneo otorgó el binomen *Lichen geographicus* a partir de la descripción de Dillenius (1742) indicando únicamente “*Habitat in Europae rupibus altis*”. Runemark en la monografía del grupo *Geographicum* (1956a) indicaba que no existía pliego de Linneo de *Rhizocarpon geographicum* y consideraba el binomen *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. como *nomina ambigua*.

La revisión de las especies tipo se realizó bajo las condiciones de conservación y manipulación detalladas en los préstamos de cada uno de los herbarios. Se tomaron diferentes medidas de los talos (forma y tamaño de las areolas y diámetro de los apotecios), de las ascósporas (tamaño y número de células por espora) y reacciones químicas más relevantes: reacción positiva a la potasa en el epihimenio (KOH) y la reacción al Pd de la médula por *spot test* sólo en aquellos casos en que este carácter es necesario para la identificación del material, como en *R. lecanorinum*, *R. drepanodes* y *R. ferax*. No se tuvo en cuenta el color del talo por tratarse de materiales muy antiguos que han podido sufrir una degradación de dicho carácter (Baral 1992). Se revisaron los caracteres anatómicos y químicos indicados por ser los caracteres descriptivos más comúnmente utilizados por los especialistas para la descripción de las especies y subespecies (Anders 1923; Räsänen 1942a y b, 1943b, 1944, 1947, 1949b; Runemark 1956a; Feuerer 1978 etc.).

Se observaron un total de 10 caracteres anatómicos y químicos: Forma de la areola plana o convexa (FAR); Areolas en forma de collar (Coll); Diámetro de la areola (DAR); Diámetro del apotecio (DAp), Número de células por espora (CSp); Longitud de las esporas (LgSp); Anchura de las esporas (AnSp); Reacción positiva del epihimenio a la KOH (KOH); reacción de la médula al Pd y al I.

Las observaciones se realizaron según las especificaciones detalladas en la Metodología general y en el apartado Material y Métodos del Capítulo 2, tomándose como mínimo 3 medidas para cada uno de los caracteres anatómicos cuantitativos como diámetro de la areola (DAr), diámetro del apotecio (DAp), número de células por espora (CSp), longitud de las esporas (LgSp) y anchura de las esporas (AnSp), observándose un total de 10 caracteres anatómicos y químicos -Tabla 1.1-.

Tabla 1.1.- Caracteres anatómicos y químicos observados en la revisión de las especies tipo.			
Caract. Macro-morfológicos	Abreviatura	Caract. Micro-morfológicos.	Abreviatura
Forma de la Areola	FAr 0= Plana 1= Convexa	Diámetro del Apotecio	DAp Precisión de 100 µm
Areolas en forma de Collar	Coll 0= Ninguna 1= Algunas 2= Todas	Células por Espora	CSp Precisión de 10 µm
		Longitud de las Esporas	LgSp Precisión de 10 µm
Diámetro de la Areola	DAr En mm.	Anchura de las Esporas	AnSp Precisión de 10 µm
Reacción al Lugol	I 0= negativa 1= Positiva	Reacción del Epihimenio a la potasa	KOH 0=negativa 1= Positiva
Reacción a la Parafenildiamina	Pd 0= Negativa 1= Positiva de color amarillo 1*= Positiva de color naranja 2= Positiva de color naranja-rojizo		

En el caso de la caracterización de las ascósporas, cuando los tipos eran muy antiguos, no fue siempre posible tomar 3 medidas por carácter observado debido al estado de conservación de las ascósporas; en estos casos, se tuvo en cuenta las anotaciones hechas sobre los pliegos por otros autores cuando el material era más fresco junto con las observaciones propias. Ha sido establecido que en especímenes antiguos determinados caracteres como las ascósporas, pueden no conservarse en buen estado (Baral 1992).

No se realizó extracción ni secuenciación de ADN de las especies tipo por no ser permitido por los herbarios conservadores cuando se trata de los tipos. Además al tratarse de materiales muy antiguos, con más de 30 años todos ellos, dificulta o impide conseguir un buen extracto de ADN (Cubero *et al.* 1998; Aras y Cansaran 2006; Redchenko *et al.* 2012).

Todas las fotografías que ilustran cada una de las descripciones son fotografías propias tomadas en el Departamento de Biología Vegetal II de la UCM bajo las especificaciones detalladas en la Metodología General.

RESULTADOS

La Tabla 1.2 muestra 130 medidas que son las medias aritméticas de más de 300 medidas tomadas en las observaciones realizadas sobre las 15 especies tipo revisadas. Las especies tipo *R. frigidum*, *R. lindsayanum* y *R. riparium* presentaron ascósporas en malas condiciones por lo que se tuvo en cuenta también las medidas dadas en las descripciones y anotada en los pliegos por distintos autores.

Especie	Nº Herbario	FAr	Coll	DAr	DAP	CSp	LgSp	AnSp	KOH	PD	I
<i>R. diabolicum</i>	H-9502464	1	1	0,93	494,9	13	26,9	14,8	1		1
<i>R. drepanodes</i>	M-0024019	1	2	0,35	473,3	32	40,8	18,3	0	1*	1
<i>R. ferax</i>	L-108361	1	2	0,53	566,7	16,8	34,4	13,2	0	1*	1
<i>R. frigidum</i>	L-587	0	0	0,46	508	10	27,6	12,6	1		1
<i>R. lecanorinum</i>	P-160822	1	2	0,77	610	31	44,6	20,5	0	2	1
<i>R. lindsayanum</i>	H-9502545	1	1	0,59	416,7	15	42,7	18,2	0		1
<i>R. macrosporum</i>	L-069173	1	1	0,76	430	30,7	46,6	19,1	1		1
<i>R. prospectans</i>	H-9502588	1	2	0,58	283,3	15,3	36,7	13,4	0		1
<i>R. riparium</i>	H-9502857	1	0	0,48	615	14	37,5	18,9	0		1
<i>R. saanaëense</i>	H-9502520	1	1	0,8	705	16	41,5	18,5	1	0	1
<i>R. sphaerosporum</i>	L-571	1	1	0,86	655,9	26,3	41,5	18,7	0		1
<i>R. sublucidum</i>	H-9502642	0	2	1,21	843,3	38	51,8	22	0		1
<i>R. tavaresii</i>	H-9502640	0	1	0,44	485	18,7	34,8	18,4	0		1
<i>R. tienei</i> subsp <i>arcticum</i>	L-582559	1	0	0,72	683,3	11,3	31,4	17,9	1		1

Tabla 1.2.- Revisión de las especies tipo: observaciones realizadas. Forma de la areola (FAr), Areolas en forma de Collar (Coll), Diámetro de la areola (DAr), Diámetro del apotecio (DAP), Número de células por espora (CSp), Longitud de las esporas (LgSp), Anchura de las esporas (AnSp), reacción del ephimeno a la KOH (1= positiva, 0= negativa), reacción de la médula al Pd (1= positiva amarillo, 1*= positiva naranja, 2= positiva roja) y reacción de la médula al I (1= positiva, 0= negativa).

A continuación se muestran las descripciones de cada una de las especies y subespecies estudiadas y fotografías de las especies tipo revisadas junto a fotografías de especímenes propios para los talos y las ascósporas.

Rhizocarpon drepanodes Feuerer Ber. Bayer. Bot. Ges. 49: 67 (1978)

Tipo: Francia, Pirineos, Haute-Garonne. Alt. 1500 m. Leg. T. Feuerer, 14-VIII-1977 (Holotipo M-0024019! M).

Materiales estudiados: – ESPAÑA: Salamanca, Las Batuecas, Sierra de Francia, 550 m, 40° 27' 35.92"N 6° 8'39.56"O, A. *Crespo*, 15-XI-2008 (MAF-16651); Cáceres, Río Ibor, Montes de Toledo, Sierra de las Villuercas, 661 m, 39° 31' 24.6"N 5° 21' 23.3"O, B. *Roca-Valiente*, 29-I-2009 (MAF-16652); Salamanca, Peña de Francia, 1723 m, 40° 30' 54.3"N 6° 10' 8.1"O, B. *Roca-Valiente* 05-VI-2009 (MAF-16738).

“Areolas y apotecios dispersos en un protalo bien desarrollado, los talos pueden crecer desde unos 3 cm de diámetro a ocupar grandes áreas. Areolas amarillas, aisladas y convexas o rodeando a los apotecios, de entre 0.5-0.8-1.4 mm de ancho. Apotecios de 0.4-0.6-0.8 mm de diámetro y circulares con margen distinto. Excípulo e hipotecio marrón-negro hasta color carbón, himenio hialino de 140-150-160 μm de espesor. Con 8 esporas por asco, multicelulares y de color marrón (39 x 18.5 μm). Médula I+, excípulo KOH+ de color rojo, apotecio y areola Pd+ amarillo. Se encuentra sobre todo en zonas montañosas sobre rocas con silicatos y con preferencia por superficies inclinada”.

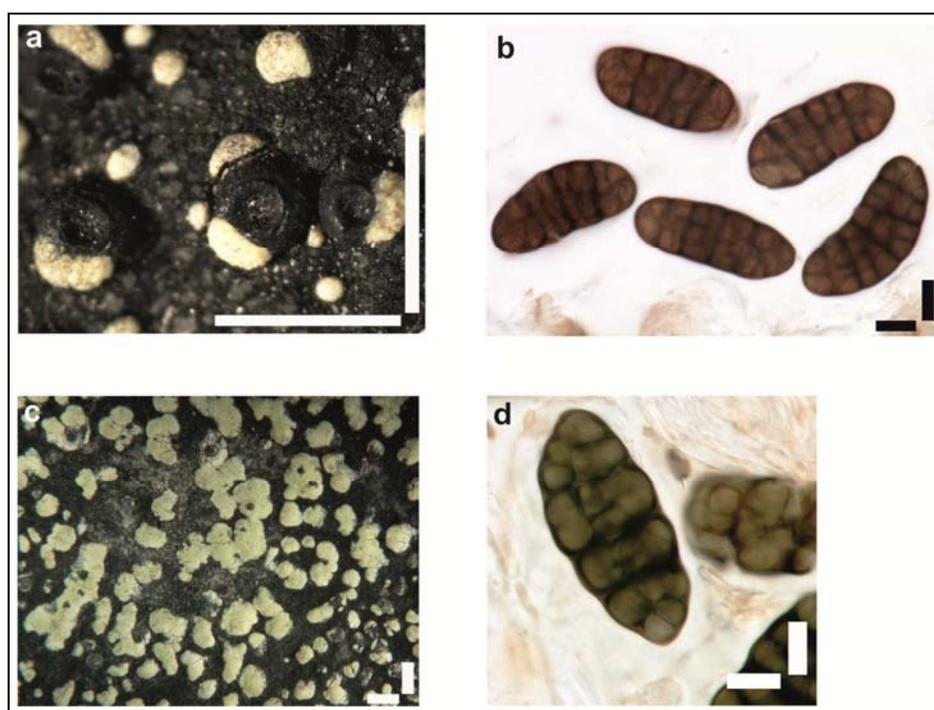


Figura 1.1.-*R. drepanodes*. Especie tipo: *R. drepanodes* M-0024019 (a y b). Material propio: *R. drepanodes* MAF-16651 (c) y MAF-16738 (d). Escala a y c= 1 mm, b y d= 10 μm .

Rhizocarpon ferax H. Magn., *Bot. Not.* **101**: 405 (1948)

Tipo: Suecia, Härjedalen; Tännäs par., cima de Ramundberget. Alt. 950 m. Leg. *B. Magnusson*, 23-III-1948 (Holotipo L-108361! UPS).

Materiales estudiados: – CHILE: Región del Maule, Paso de Pino Hachado, 1987 m, 38°39'27"S 70°53'47"O, *S. Pérez-Ortega & F. Fdez.-Mendoza*, 01-IV-2009 (MAF-17670); Tierra de Fuego, subida a los Dientes de Navarino, 54°58'11"S 67°33'27"O, 693 m, *S. Pérez-Ortega* 25-I-2008 (MAF-17684).

“Talo con forma de mancha, areolas pequeñas (0.5-1 mm de diámetro) por lo general formando grupos pequeños, son de forma irregular, alargada, gruesas, convexas, de color amarillo a amarillo verdoso se encuentran dispersas encima de un protalo (o hipotalo) negro muy fino y que desaparece entre las areolas cuando estas forman grupos. Reacción de la médula I+, Pd+ y KOH-. La forma de las areolas depende del desarrollo de los apotecios, que son frecuentes y crecen pegados a las areolas hacia el interior de estas, con forma de disco plano de color negro, de 0.4-0.6 mm de diámetro, irregulares o angulares con la superficie rugosa. Apotecios con margen indistinto, altura de 0.2 a 0.3 mm. Excípulo marrón oscuro KOH+ de color rojo-violeta. Hipotecio negro-marrón. Himenio alto (100-150 μm) y hialino o amarillento oliva. Epihimenio azulado, verde o marrón verdoso, reacción KOH+ verde oliva o a veces ligeramente morada. Esporas muriformes, con tres septos, entre 8 y 10 células por espora y de color verde oscuro (25-35 x 14-17 μm).”

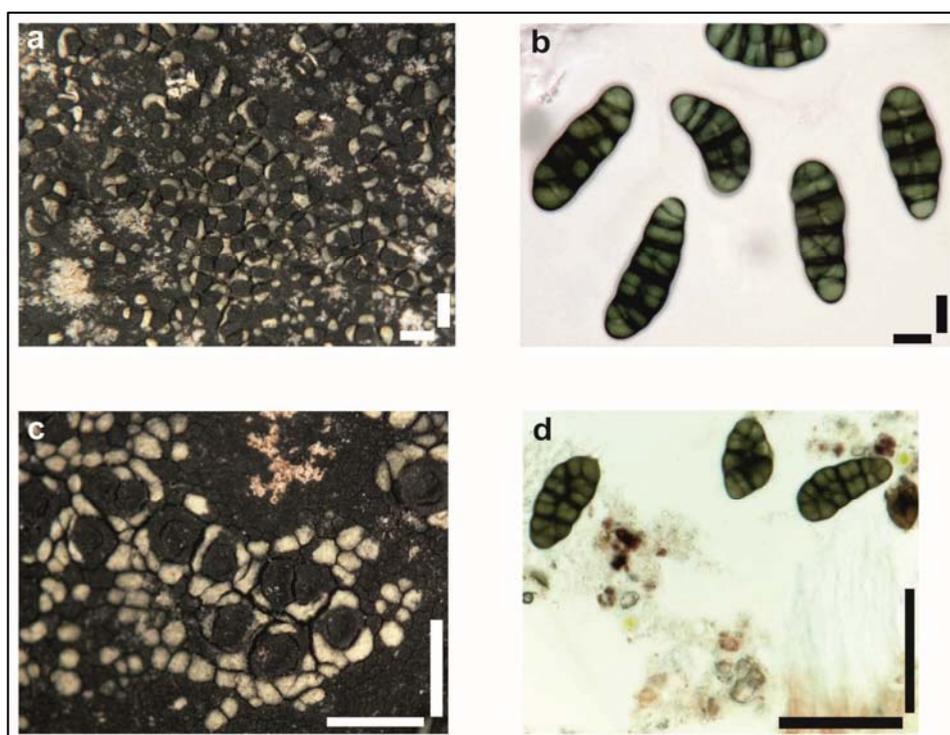


Figura 1.2.-*R. ferax*. Especie tipo: *R. ferax* L-108361 (a y b). Material propio: *R. ferax* MAF-17684 (c y d). Escala: a y c= 1mm, b= 10 μm , d= 50 μm .

Rhizocarpon geographicum (L.) DC. subsp. *arcticum* (Runem.) Hertel, *Mitt. Bot.*

Staassamml. München **12**: 493 (1976)

Basion.: *Rhizocarpon tinei* (Tornab.) subsp. *arcticum* Runem. *Opera Bot.* **2** (1): 125 (1956).

Tipo: Suecia, Härjedalen: Tännäs par., cima de Rössvålen [Rössvålen]. Alt. 950 m; lat. 62.76667; long. 13.35. Leg. *B. Magnusson*, 26-III-1948 (Holotipo L-582559!, UPS sub. *Rhizocarpon geographicum* var. *atrovirens*).

Materiales estudiados: – NORUEGA: Is. Svalbard, Longyearbyen, 63 m, 78°13'N 15°36'E, *L. G. Sancho & A. Pintado*, 27-VI-2007 (MAF-17603). – REINO UNIDO: Escocia, Is. Skye, 70 m, 57°12'55"N 05°50'19"O, *F. Fdez-Mendoza, S. Pérez-Ortega & M. Vivas*, 10-VIII-2010 (MAF-17616). – ESTADOS UNIDOS, Alaska, Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway, 948 m, 59°36'N 135°09'O, *S. Pérez-Ortega* 01-VIII-2008 (MAF-17633). – CHILE: Tierra de Fuego, Parque Nacional de Pali Aike, 195 m, 52°05'S 69°42'O, *S. Pérez-Ortega*, 12-I-2008 (MAF-17680); Puerto Avarino frente a la Is. Hoste, 0 m, 54°55'48"S 68°20'45"O, *S. Pérez-Ortega*, 27-I-2008 (MAF-17685). – ANTÁRTIDA: Victoria Land, Monte Kyffin, 606 m, 83°48'S 172°13'E, *L. G. Sancho*, 19-I-2011 (MAF-Lich 17704).

“Talo de entre 1-5 cm de diámetro. Las areolas aparecen pegadas junto a los apotecios o dispersas en un protalo diferenciado. Areolas de 0.4-1 mm de diámetro, 0.2-0.6 mm de espesor (altura), angulares a redondeadas, planas o convexas de color blanquecino a amarillo-blancuzco, superficie lisa y mate. Apotecio de 0.5-1 mm de diámetro, 0.3-0.5 mm de altura, redondeados angulares a circulares, a menudo con margen persistente. Himenio de 100-150 µm de espesor. Esporas muriformes con pocos septos (22-30 x 10-16 µm). Médula Pd– o Pd+ amarillo. Se suelen encontrar en rocas expuestas y es casi exclusivo del cinturón alpino.”

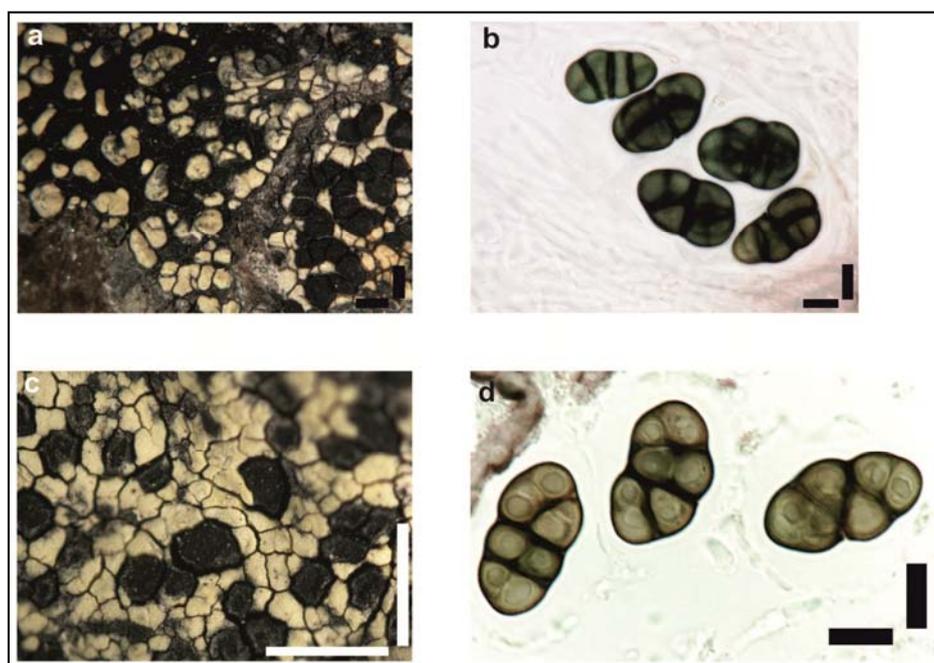


Figura 1.3.-*R. geographicum* subsp. *arcticum*. Especie tipo: *R. tinei* subsp. *arcticum* L-582559 (a y b). Material propio: *R. geographicum* subsp. *arcticum* MAF-17680 (c y d). Escala: a y c= 1 mm, b y d= 10 µm.

Rhizocarpon geographicum (L.) DC. subsp. *diabasicum* (Räs.) Poelt & Vězda [In Hawksworth, James & Coppins], *Lichenologist* **12** (1): 107 (1980)

Basion.: *Rhizocarpon diabasicum* Räs. *Ann. Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn. "Vanamo"* **16**, Not. 12: 59 (1942).

Tipo: Finlandia, Kemi, Kivalot, Keskipienikka. Leg. V. Räsänen, 22-VIII-1942 (Holotipo H-9502464! H).

Materiales estudiados: – ESPAÑA: Ávila, Sierra de Gredos, Plataforma de Gredos, Los Barrerones, 2190 m, 40°16'13"N 05°15'39"O, *B. Roca-Valiente*, 02-V-2008 (MAF-16668); Lérida, Pirineos, Parque Nacional de Aigüestortes, 2570 m, 42°36'29"N 0°53'15"O, *B. Roca-Valiente*, 14-VII-2009 (MAF-16722); Salamana, Sierra de Francia, Peña de Francia, 1723 m, 40°30'54"N 06°10'08"O, *B. Roca-Valiente*, 05-VI-2009 (MAF-16730, MAF-16733); Is. de Gran Canaria, Vega de San Mateo a Tenteniguada, 976 m, 29°59'43"N 15°31'54"O, *A. Crespo*, 17-VI-2009 (MAF-17630). – NORUEGA: Is. Svalbard, Longyearbyen, nevero próximo al Hotel Svalbard, 86 m, 78°12'N 15°37'E, *L. G. Sancho & A. Pintado* 26-VI-2007 (MAF-17607); Kaap Linné, 145 m, 77°59'N 12°44'E, *L. G. Sancho & A. Pintado*, 02-VII-2007 (MAF-17612). – REINO UNIDO: Escocia, Is. Skye, 70 m, 57°12'55"N 05°50'19"O, *F. Fdez.-Mendoza, S. Pérez-Ortega & M. Vivas* 10-VIII-2010 (MAF-17621). – MÉXICO: Volcán Iztaccíhuatl, subida al volcán, 4400 m, 19°09'1"N 98°38'37"O, *B. Roca-Valiente* 05-XI-2008 (MAF-17659). – ESTADOS UNIDOS: Alaska, Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway, 1078 m, 59°37'N 135°09'O, *S. Pérez-Ortega*, 31-VII-2008 (MAF-17635). – CHILE: Tierra de Fuego, Parque Nacional de las Torres del Paine, Lago Sarmiento, 160 m, 51°02'57"S 72°56'11"O, *S. Pérez-Ortega* 16-I-2008 (MAF-Lich 17679). – ANTÁRTIDA: Is. Livingston, Caleta Española, 25 m, 62°39'S 60°23'O, *P. Raggio*, 05-I-2009 (MAF-17695). – NUEVA ZELANDA: Styx Creek, Central Otago, 1100 m 45°28'S 169°58'E, *M. Vivas* 02-II-2011 (MAF-Lich 17712, MAF-Lich 17713, MAF-17717). – TAIWAN: Pico Monte Nanhu, 3712 m, 24°21'38"N 121°26'27"E, *Y. Ohmura*, 03-X-2010 (MAF-17722); Subida al Monte Nanhu, 3175 m, 24°22'52"N 121°25'15"E, *Y. Ohmura*, 01-X-2010 (MAF-17728).

“Talo con areolas dispersas, de color amarillo azufre brillante, Pd+ amarillo y I+ azul. Areolas hinchadas, lisas y pulidas, desnudas, sub-nítidas y con un diámetro de 1-3 mm. Apotecios negros, lisos, planos y ligeramente in-marginados, de diámetro entre 0.5-1 mm, suelen situarse cerca de las areolas. Himenio hialino de 115-145 µm de espesor. Epitecio KOH+ purpura. Hipotecio marrón-negro KOH -. Las esporas son elipsoides, oblongas, marrones y murales con 3-5 septos (20-35-42 x 10-14.5 µm). Talo Pd+ amarillo.”

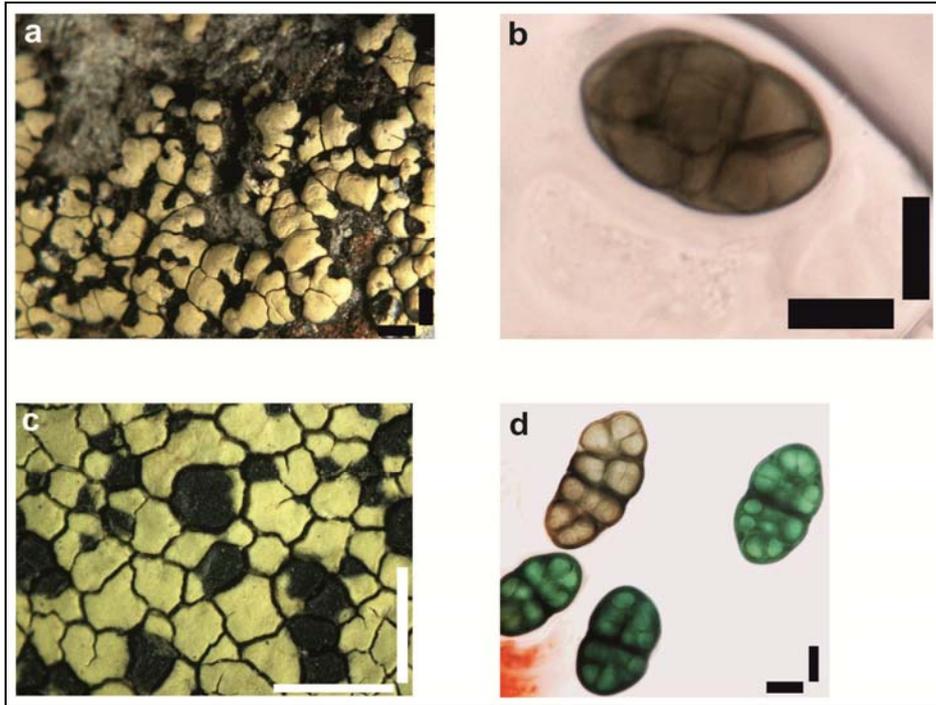


Figura 1.4.-*R. geographicum* subsp. *diabasicum*. Especie tipo: *R. diabasicum* H-9502464 (a y b). Material propio: *R. geographicum* subsp. *diabasicum* MAF-16733(c) y MAF-16730 (d). Escala: a y c= 1 mm, b y d= 10 μ m.

Rhizocarpon geographicum (L.) DC. subsp. *frigidum* (Räs.) Hertel, *Mitt. Bot. Staassamml. München* **12**: 492 (1976)

Basion.: *Rhizocarpon frigidum* Räs. *Ann. Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn.* "Vanamo" **19**, Not. 14: 9 (1944).

Tipo: Rusia, Siberia, Guv. Jenisejsk, Dudinka (Expedición sueca a Jenisej flum.). lat. 69° 35'. Leg. *M. Brenner*, 29-VII-1876 (Holotipo L-587!, S sub. *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC.).

Materiales estudiados: – ESPAÑA: Madrid, Sierra de Guadarrama, Pico de la Najarra, 2020 m, 40°49'15"N 03°49'48"O, *B. Roca-Valiente & S. Pérez Ortega*, 25-X-2007 (MAF-16641, MAF-16646); Ávila, Sierra de Gredos, Plataforma de Gredos, Los Barrerones, 2190 m, 40°16'13"N 05°15'39"O, *B. Roca-Valiente*, 02-V-2008 (MAF-16662, MAF-16666); Granada, Sierra Nevada, Observatorio de Mohón del Trigo, 2576 m, 37°05'28"N 03°23'02"O, *B. Roca-Valiente & G. Amo*, 13-VI-2008 (MAF-16677, MAF-16683); Lérida, Pirineos, Parque Nacional de Aigüestortes, 2570 m, 42°36'29"N 0°53'15"O, *B. Roca-Valiente* 14-VII-2009 (MAF-16721); Sierra de Francia, Peña de Francia, 1723 m, 40°30'54"N 06°10'08"O, *B. Roca-Valiente* 05-VI-2009 (MAF-16732). – PORTUGAL: Sierra de Estrella, 1930 m, 40°19'44"N 07°36'08"O, *M. Vivas & A. Lumbreras* 26-III-2009 (MAF-16709). – NORUEGA: Is. Svalbard, Longyearbyen, nevero próximo al Hotel Svalbard, 86 m, 78°12'N 15°37'E, *L. G. Sancho & A. Pintado*, 26-VI-2007 (MAF-17606); Kaap Linné, 145 m, 77°59'N 12°44'E, *L. G. Sancho & A. Pintado* 02-VII-2007 (MAF-17610). – ESTADOS UNIDOS. Alaska: Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway, 948 m, 59°36'N 135°08'O, *S. Pérez-Ortega* 01-VIII-2008 (MAF-17637, MAF-17638). – ESTADOS UNIDOS: Colorado, Montañas Rocosas, Condado de Chaffee, 3691 m 38°49'39"N 106°24'19"O, *F. Fdez.-Mendoza*, 1-VIII-2009 (MAF-17649). – CHILE: Región del Maule, Paso de Pino Hachado, 1987 m, 38°39'27"S 70°53'47"O, *S. Pérez-Ortega & F. Fdez.-Mendoza* 01-IV-2009 (MAF-17673). – ANTÁRTIDA: Is. Livingston, Pico Radio, 130 m, 62°39'S 60°23'O, *P. Raggio*, 01-I-2009 (MAF-17690, MAF-17691). – NUEVA ZELANDA: Styx Creek, Central Otajo, 1100 m, 45°28'S 169°58'E, *M. Vivas*, 02-II-2011 (MAF-17710, MAF-17711, MAF-17716).

“Talo sub-orbicular de 2 a 4 cm de lado y crustáceo, areolado disperso de 1-3 mm de lado, más o menos redondeado y no irradiado. KOH-, Pd- y I+ azul. Areolas planas o ligeramente convexas, angulares, dispersas hacia el centro, de 0.2-0.4mm de diámetro, de color amarillo a amarillo-blanquecino pálido, desnudas y opacas. Protalo negro bien desarrollado. Apotecios abundantes especialmente frecuentes en el centro, se desarrollan por encima del protalo, son negros, desnudos, opacos, cóncavos y angulares con un margen grueso y de 0.2-0.6 mm de diámetro. Himenio hialino o gris, de 90-125 µm de espesor. Epitecio marrón rojizo, KOH+ purpura. Hipotecio marrón, KOH- o rojo pálido. Esporas; 8 por asco, marrones o pardas-negras, oblongas, murales o sub-murales, con 3 septos en la madurez (26-29 x 9-12 µm).”

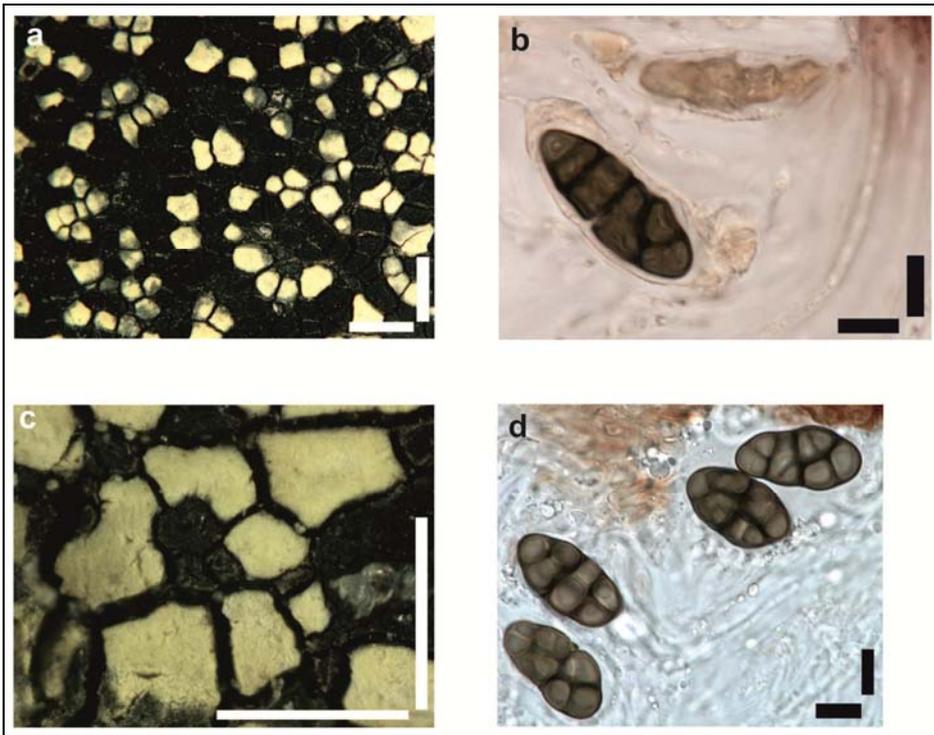


Figura 1.5.-*R. geographicum* subsp. *frigidum*. Especie tipo: *R. frigidum* L-587 (a y b). Material propio: *R. geographicum* subsp. *frigidum* MAF-16709 (c) y MAF-16732 (d). Escala: a y c= 1 mm, b y d= 10 μ m.

Rhizocarpon geographicum (L.) DC. subsp. *geographicum*, [in Lamarck & De Candolle

Flore Française 2: 365 (1805)]

Basion.: *Lichen geographicus* L. *Species Plantarum*, Tomo II: 1140-1141 (1753).

Tipo: No existen especímenes de *Lichen geographicus* L. en el Herbario de Linneo.

Materiales estudiados: – ESPAÑA: Lerida, Pirineos, Parque nacional de Aigüestortes, 2570 m, 42°36'29"N 0°53'15"O, *B. Roca-Valiente*, 14-VII-2009 (MAF-16718, MAF-16719). – NORUEGA: Is. Svalbard, Longyearbyen, Kaap Linné, 78°02'N 13°43'E, 86 m, *L. G. Sancho & A. Pintado*, 01-VII-2007 (MAF-17611). – ESTADOS UNIDOS: Alaska, Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway, 454 m, 59°40'N 135°15'O, *S. Pérez-Ortega*, 27-VII-2008 (MAF-17644). – CHILE: Región del Maule, Paso de Pino Hachado, 1987 m, 38°39'27"S 70°53'47"O, *S. Pérez-Ortega & F. Fdez.-Mendoza*, 01-IV-2009 (MAF-17674). – ANTÁRTIDA: Is. Livingston, Pico Radio, 130 m, 62°39'S 60°23'O, *P. Raggio*, 28-XII-2008 (MAF-17692, MAF-17693); Victoria Land, Monte Kyffin, 606 m, 83°48'S 172°13'E, *L. G. Sancho*, 19-I-2011 (MAF-17703) – NUEVA ZELANDA: Styx Creek, Central Otajo, 1100 m, 45°28'S 169°58'E, *M. Vivas*, 02-II-2011 (MAF-17706, MAF-17715).

***Observaciones:** Las descripciones realizadas para *Lichen geographicus* (Linneo 1753) así como para *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC (Lamarck y De Candolle 1805) son descripciones muy someras. El tipo no se pudo encontrar, en sucesivas consultas, en la digitalización del Herbario de Linneo (última efectuada el 07.02.2013), ya que probablemente no exista (Runemark 1956a). Siguiendo el concepto de Poelt (1988) que acepta como *R. geographicum* subsp. *geographicum* el nombre de *R. tinei* subsp. *vulgare* de Runemark (1956a) se siguió la descripción de esta última especie.

“Talo de 2-8 cm de diámetro. Areola y apotecio crecen pegados formando un talo continuo. Protalo normalmente visible, también entre las areolas. Areolas de 0.4-0.8 mm de diámetro, 0.3-0.6 mm de espesor, normalmente angulares, más o menos planas, de color normalmente amarillo verdoso y raramente amarillo intenso, lisas mate (raramente brillantes). Apotecio de 0.3-0.7 mm de diámetro, 0.3-0.5 mm de altura, estrictamente angulares planos, margen normalmente indistinto. Himenio de 110-160 µm de espesor. Esporas muriformes con pocos septos (20-32 x 10-15 µm).”

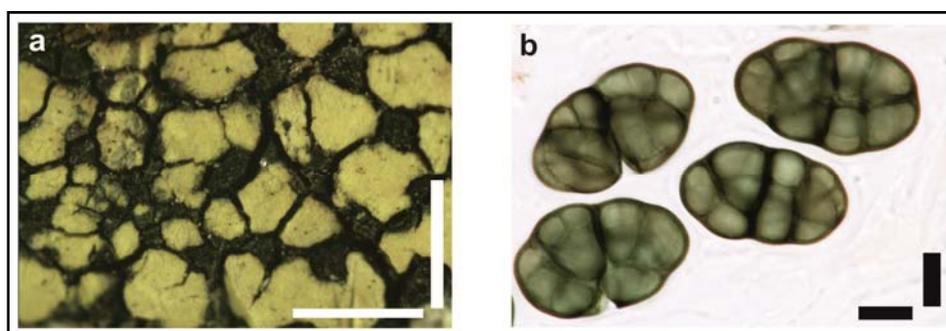


Figura 1.6.-*R. geographicum* subsp. *geographicum*. Material propio: *R. geographicum* subsp. *geographicum* MAF-16718 (c) y MAF-17674 (d). Escala: a= 1 mm, b= 10 µm.

Rhizocarpon geographicum (L.) DC. subsp. *prospectans* (Räs.) D. Hawksw. & Sowter,
Trans. Leicester Lit. Soc. **63**: 58 (1969)

Basion.: *Rhizocarpon prospectans* Räs. *Ann. Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn. "Vanamo"* **19**, Not. 14: 8 (1944).

Tipo: Francia, Nante, Sant Maixent (Deux Lévres). Leg. *J. Richard*, 1873 (Isotipo H-9502588!, H sub. *Lecidea geographica* var. *prospectans* Herb. Nyl. 10257).

Materiales estudiados: – ESPAÑA: Avila, Sierra de Gredos, Plataforma de Gredos, Los Barrerones, 2190 m, 40°16'13"N 05°15'39"O, *B. Roca-Valiente*, 02-V-2008 (MAF-16659, MAF-16663); Segovia, Sierra de Somosierra-Sierra de Ayllón, Pico del Lobo, 2190 m, 41°11'32"N 03°27'57"O, *B. Roca-Valiente* & *S. Pérez-Ortega* 01-XI-2007 (MAF-16692, MAF-16693-2); Lérida, Pirineos, Parque Nacional de Aigüestortes, 2570 m, 42°36'29"N 0°53'15"O, *B. Roca-Valiente*, 14-VII-2009 (MAF-16726). – ESTADOS UNIDOS: Alaska: Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway, 1019 m, 59°37'N 135°09'O, *S. Pérez-Ortega*, 30-VII-2008 (MAF-17642). – REINO UNIDO: Escocia, Is. Skye, 70 m, 57°12'55"N 05°50'19"O, *F. Fdez.-Mendoza*, *S. Pérez-Ortega* & *M. Vivas*, 10-X-2010 (MAF-17615). CHILE: Tierra de Fuego, frente a la Is. Snipe, 0 m, 54°57'41"S 67°11'36"O, *S. Pérez-Ortega*, 23-II-2008 (MAF-17683).

“Talo parte continuo, parte discontinuo o disperso, areolado a tramos, liso y pulido, es también fino y brillante, KOH–, Pd+ amarillo, I+ azul. Protalo negro visible entre las islas formadas por las areolas. Apotecios dispersos, elevados, circulares, negros, desnudos, casi inmarginado, forma de disco plano. Himenio delgado, 90 µm de espesor, hialino. Epitecio marrón-negro, KOH- o ligeramente púrpura oscuro. Hipotecio marrón KOH-. Paráfisis articuladas y ramificadas. Esporas: 8 por asco, marrones o al final de color negro-marrón, oblongas, con tres septos, sub-murales o también murales (17-28 x 9-12 µm).”

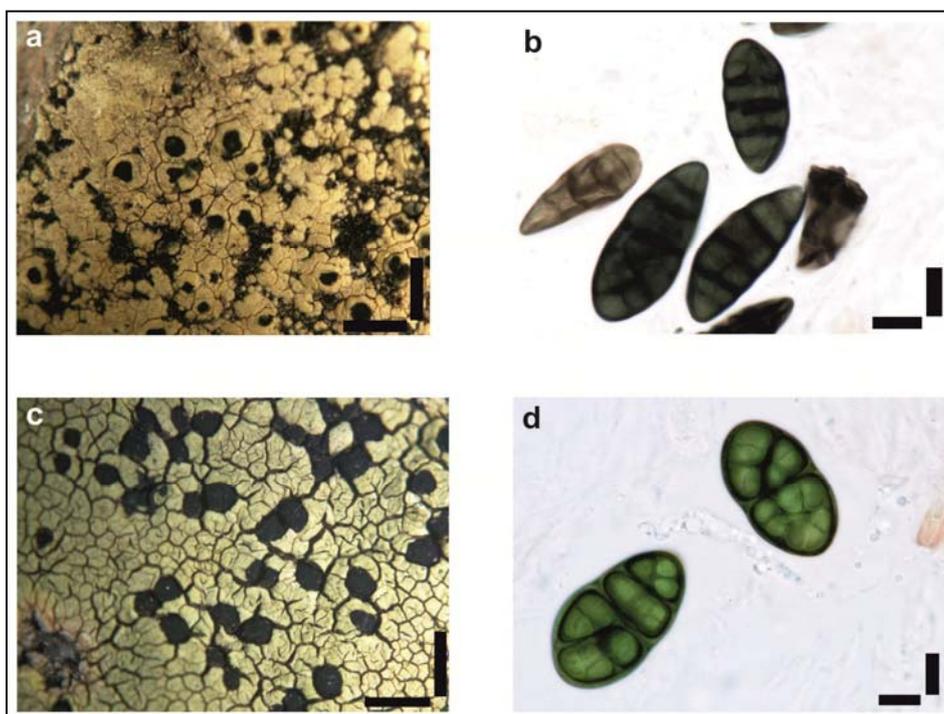


Figura 1.7.-*R. geographicum* subsp. *prospectans*. Especie tipo: *R. prospectans* H-9502588 (a y b). Material propio: *R. geographicum* subsp. *prospectans* MAF-16726 (c) MAF-16659 (d). Escala: a y c= 1 mm, b y d= 10 µm.

Rhizocarpon lecanorinum Anders, *Hedwigia* 64: 261 (1923)

Tipo: Republica Checa, Bohemia, Česka Lipa, Röhrsdort. Leg. *J. Anders*, 3-VIII-1920 (Lectotipo PRM-160822! PRM).

Materiales estudiados: – ESPAÑA: Ávila, Sierra de Gredos, Plataforma de Gredos, Los Barrerones, 2190 m, 40°16'13"N 05°15'39"O, *B. Roca-Valiente*, 2-V-2008 (MAF-16665, MAF-16670, MAF-16672); Ávila, Sierra de Gredos, La Hija de Dios, 1230 m, 40°31'37"N 04°57'53"O, *B. Roca-Valiente*, 5-IV-2008 (MAF-16673); Granada, Sierra Nevada, Observatorio de Mohón del Trigo, 2576 m, 37°05'28"N 03°23'02"O, *B. Roca-Valiente & G. Amo*, 13-VI-2008 (MAF-16689); Huesca, Pre Pirineo, Sierra de Guara, 890 m, 42°29'22"N 0°16'58"O, *S. García Catalá & J. C. Zamora*, 10-X-2009 (MAF-16715); Salamanca, Sierra de Francia, Peña de Francia, 1723 m, 40°30'54"N 06°10'08"O, *B. Roca-Valiente* 05-VI-2009 (MAF-16731). – PORTUGAL: Sierra de Estrella, 1930 m, 40°19'44"N 07°36'08"O, *M. Vivas & A. Lumbreras* 26-III-2009 (MAF-16705). – ANTÁRTIDA: Is. Livingston, Caleta Española, 25 m, 62°39'S 60°23'O, *P. Raggio*, 05-I-2009 (MAF-17688). – INDIA: Uttaranchal, Badhrinath, en el camino de Manas a las Cataratas de Vasundhara, 3600 m, 30°47'40"N 79°29'32"E, *P. K. Divakar*, 02-VIII-2007 (MAF-17739). – CHILE: Región de la Araucanía Pucón, Volcán Villarica, 1593 m, 39°23'51"S 71°56'45"O, *S. Pérez-Ortega & F. Fdez.-Mendoza*, 31-III-2009 (MAF-17664, MAF-17666). – ESTADOS UNIDOS: Alaska: Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway, 1011 m, 59°37'N 135°09'O, *S. Pérez-Ortega*, 30-VII-2008 (MAF-17640). – REINO UNIDO: Escocia, Is. Skye, 70 m, 57°12'55"N 05°50'19"O, *F. Fdez.-Mendoza, S. Pérez-Ortega & M. Vivas*, 10-VIII-2010 (MAF-17622). – MÉXICO: Volcán Iztaccihuatl, subida al volcán, 4400 m, 19°09'1"N 98°38'37" W, *B. Roca-Valiente*, 05-XI-2008 (MAF-17662). – TAIWAN: Subida al Monte Nanhu, 3175 m, 24°22'52"N 121°25'15"E, *Y. Ohmura*, 01-X-2010 (MAF-17726, MAF-17727).

“Talo verrugoso de color amarillo verdoso, KOH-, PD – e I+ azul. Areolas crecen alrededor del apotecio en los ejemplare observados. Protalo negro, con reacción KOH+ marrón-rojizo en algunos de los ejemplares observados, que se extiende a las areolas. Apotecio de color negro, parcialmente lecanorino, desnudo, in-marginado. Himenio de color oliváceo o color óxido o raramente hialino, de 200 µm de espesor. Esporas grandes, murales, multicelulares, no menos de 4 septos incluso en especímenes juveniles (42-67 x 17-25 µm).”

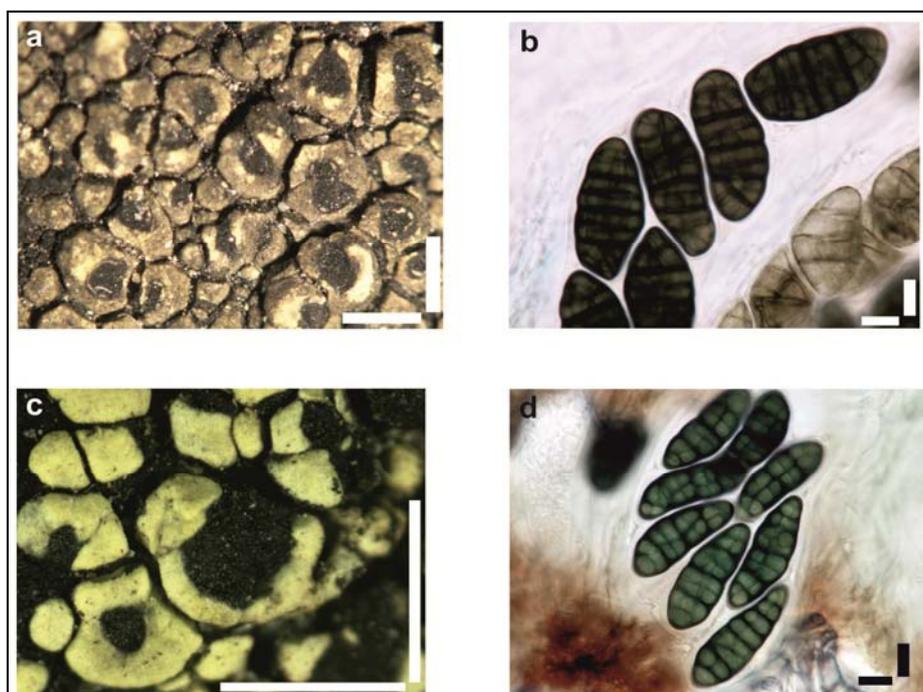


Figura 1.8.-*R. lecanorinum*. Especie tipo: *R. lecanorinum* PRM-160822 (a y b). Material propio: *R. lecanorinum* MAF-16705 (c) MAF-16731 (d). Escala: a y c= 1 mm, b y d= 10 µm.

Rhizocarpon macrosporum Räs., *Feddes Repert. Spec. Nov. Regni Veg.* **52**: 139 (1943b)

Tipo: Suiza, Graubünden, Sant Moriz. Leg. *Ph. Hepp*, 1853 (Holotipo L-069173!, UPS sub. *Lecidea geographica* var. *atrovirens*).

Materiales estudiados: – ESPAÑA: Madrid, Sierra de Guadarrama, Pico de la Najarra, 2020 m, 40°49'15"N 03°49'48"O, *B. Roca-Valiente* & *S. Pérez Ortega*, 25-X-2007 (MAF-16635); Segovia, Sierra de Somosierra-Sierra de Ayllón, Pico del Lobo, 2190 m, 41°11'32"N 03°27'57"O, *B. Roca-Valiente* & *S. Pérez Ortega*, 01-XI-2007 (MAF-16699, MAF-16700); Granada, Sierra Nevada, Observatorio de Mohón del Trigo, 2576 m, 37°05'28"N 03°23'02"O, *B. Roca-Valiente* & *G. Amo*, 13-VI-2008 (MAF-16678); Huesca, Pre-Pirineo, Sierra de Guara, 890 m, 42°29'22"N 0°16'58"O, *S. García Catalá* & *J. C. Zamora*, 10-X-2009 (MAF-16716); Lérida, Pirineos, Parque nacional de Aigüestortes, 2570 m, 42°36'29"N 0°53'15"O, *B. Roca-Valiente* 14-VII-2009 (MAF-16723); Salamanca, Sierra de Francia, Peña de Francia, 1723 m, 40°30'54"N 06°10'08"O, *B. Roca-Valiente* 05-VI-2009 (MAF-16737, MAF-16740, MAF-16741); Is. de La Palma, Carretera al Roque, pasado el cruce al Pico de la Nieve, 1993 m, 28°44'33"N 17°49'37"O, *A. Crespo*, 25-VI-2009 (MAF-17626, MAF-17627); Is. de La Gomera, Carretera de Alajeró, 800 m, 28°03'38"N 17°14'27"O, *A. Crespo*, 04-VIII-2009 (MAF-17629). – PORTUGAL: Sierra de Estrella, 1930 m, 40°19'44"N 07°36'08"O, *M. Vivas* & *A. Lumbrera*, 26-III-2009 (MAF-16703, MAF-16711). – NORUEGA: Is. Svalbard, Longyearbyen, 63 m, 78°13'N 15°36'E, *L. G. Sancho* & *A. Pintado* 27-VI-2007 (MAF-17604, MAF-17613); Morrena glaciar Linné, 103 m 77°58'N 13°54'E, *L. G. Sancho* & *A. Pintado* 04-VII-2007 (MAF-17609). – REINO UNIDO: Escocia, Is. Skye, 70 m, 57°12'55"N 05°50'19"O, *F. Fdez.-Mendoza*, *S. Pérez-Ortega* & *M. Vivas* 10-VIII-2010 (MAF-17618, MAF-17619). – ESTADOS UNIDOS: Alaska, Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway, 442 m, 59°40'N 135°15'O, *S. Pérez-Ortega* 27-VII-2008 (MAF-17645); Colorado: Montañas Rocosas, Condado de Chaffee, 3691 m, 38°49'39"N 106°24'19"O, *F. Fdez.-Mendoza* VIII-2009 (MAF-17647). – CHILE: Región del Maule, Paso de Pino Hachado, 1987 m, 38°39'27"S 70°53'47"O, *S. Pérez-Ortega* & *F. Fdez.-Mendoza* 01-IV-2009 (MAF-17675); Región de la Araucanía Pucón, Volcán Villarica, 1593 m, 39°23'51"S 71°56'45"O, *S. Pérez-Ortega* & *F. Fdez.-Mendoza*, 31-III-2009 (MAF-17667). – MÉXICO: Volcán Iztaccíhuatl, Morrena del Glaciar Ayoloco, 4687 m, 19°09'58"N 98°28'46"W, *B. Roca-Valiente*, 04-XI-2008 (MAF-17651, MAF-17655, MAF-17657). – ANTÁRTIDA: Is. Livingston, Caleta Española, 25 m, 62°39'S 60°23'O, *P. Raggio*, 05-I-2009 (MAF-17689, MAF-17694). – NUEVA ZELANDA: Styx Creek, Central Otajo, 1100 m, 45°28'S 169°58'E, *M. Vivas*, 02-II-2011 (MAF-17708). – TAIWAN: Pico Monte Nanhu, 3712 m, 24°21'38"N 121°26'27"E, *Y. Ohmura*, 03-X-2010 (MAF-17718, MAF-17719, MAF-17720). – INDIA: Uttaranchal, Badhrinath, en el camino de Manas a las Cataratas de Vasundhara, 3600 m, 30°47'40"N 79°29'32"E, *P. K. Divakar*, 02-VIII-2007 (MAF-17736, MAF-17737).

“Talo areolado discontinuo uniforme KOH-, Pd+ amarillo, I+ azul. Protalo negro con los márgenes bien desarrollados. Areolas contiguas, planas, lisas o casi lisas y pulidas, de color amarillo o amarillento, desnuda, de 0.2-1 mm de diámetro. Los apotecios se encuentran entre las areolas, son planos, negros, manchados, con frecuencia angulares, no circulares y por lo general marginados, de 0.2-0.4 mm de ancho. Himenio de 180 µm de altura, hialino o color oliva pálido. Epitecio marrón oscuro, KOH+ rojo. Hipotecio marrón oscuro-negro KOH- o + ligeramente rojo. Esporas; 8 por asco (o de 4 a 6) de color marrón oscuro, murales, pluricelulares con (5)7-11 septos, oblongas (37-60x14-18.5 µm) o ampliamente ovoides (32x21 µm).”

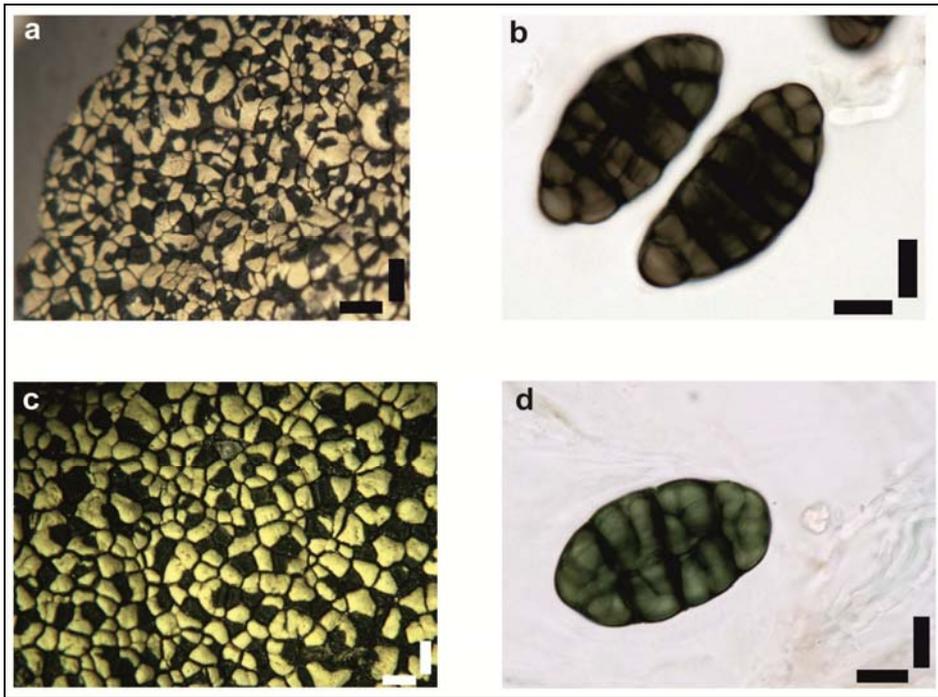


Figura 1.9.-*R. macrosporum*. Especie tipo: *R. macrosporum* L-069173 (a y b). Material propio: *R. macrosporum* MAF-16700 (c) MAF-16723 (d). Escala: a y c= 1 mm, b y d= 10 μ m.

Rhizocarpon nidificum (Hue) Darb., *Brit. Antarct. (Terra Nova) Exp. 1910 Nat. Hist. Rep. Bot.* **1** (3): 48 (1923)

Basion.: *Lecidea nidifica* Hue, *2me Exp. Antarct. Franç. Lich.*: 171. (1915).

Tipo: Península Antártica, Booth Island, Jeanne Hill. Leg. *M. Hue*, 03-I-1909 (Tipo PC-0001278e, P).

Materiales estudiados: – Antártida: Victoria Land, Monte Kyffin, 606 m, 83°48'S 172°13'E, *L. G. Sancho*, 19-I-2011 (MAF-17701, MAF-17702, MAF-17705).

Talo de color amarillo paja pálido, opaco areolado. Areolas a menudo de 0.2-0.3 mm de diámetro y raramente de 0.5-0.6 mm, 250-400 μm de espesor, frecuentemente angulares continuas, superficie arrugada. Márgenes con un protalo estrecho y negro que a veces se hace más amplio. Medula I– o +. Apotecios poco frecuentes (raros), negros, innatos en las areolas, in-marginados, (circulares o de forma oblonga) con forma de disco plano. Esporas; 8 por asco, ascósporas oscuras (negras a rojizas), constreñidas en los septos con halo evanescente uni– o tri-septadas (20-27-34 x 10-12-15 μm).

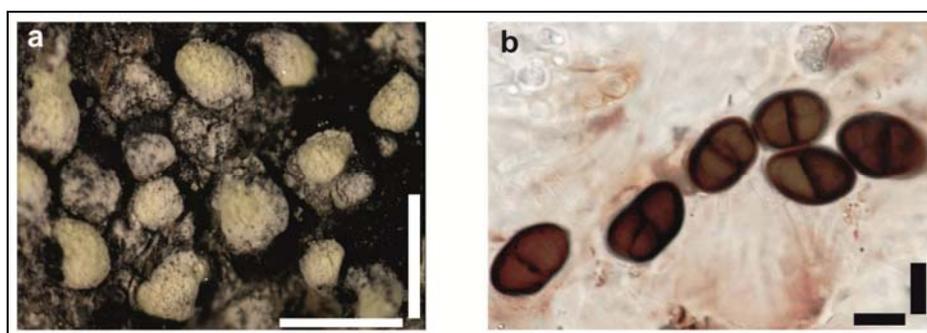


Figura 1.10.-*R. nidificum*. Material propio: *R. nidificum* MAF-17702 (a y b).
Escala: a= 1 mm, b= 10 μm .

Rhizocarpon riparium (Räs.) subsp. *lindsayanum* (Räs.) Thoms., *Nova Hedwigia* **14**: 456 (1967)

Basion.: *Rhizocarpon lindsayanum* Räs., *Revista Sudamer. Bot.* **7**: 87 (1942b).

Tipo: Inglaterra, Dunkeld, Birnam Hill. Leg. *L. Lindsay*, IV-1856 (Holotipo H-9502545!, H sub. *Lecidea geographica* L.).

Materiales estudiados: – ESPAÑA: Madrid, Sierra de Guadarrama, Pico de la Najarra, 2020 m, 40°49'15"N 03°49'48"O, *B. Roca-Valiente* & *S. Pérez Ortega*, 25-X-2007 (MAF-16638, MAF-16644, MAF-16647, MAF-16650); Ávila, Sierra de Gredos, Plataforma de Gredos, Los Barrerones, 2190 m, 40°16'13"N 05°15'39"O, *B. Roca-Valiente*, 02-V-2008 (MAF-16656, MAF-16667, MAF-16671); Granada, Sierra Nevada, Observatorio de Mohón del Trigo, 2576 m, 37°05'28"N 03°23'02"O, *B. Roca-Valiente* & *G. Amo*, 13-VI-2008 (MAF-16681); Segovia, Sierra de Somosierra-Sierra de Ayllón, Pico del Lobo, 2190 m, 41°11'32"N 03°27'57"O, *B. Roca-Valiente* & *S. Pérez Ortega*, 01-XI-2007 (MAF-16690, MAF-16698); Lérida, Pirineos, Parque Nacional de Aigüestortes, 2570 m, 42°36'29"N 0°53'15"O, *B. Roca-Valiente*, 14-VII-2009 (MAF-16724, MAF-16725); Is. de Tenerife, Junto al Mirador de Ortuño, 1590 m, 28°24'11"N 16°25'22"O, *A. Crespo*, 02-VI-2009 (MAF-17632). – PORTUGAL: Sierra de Estrella, 1930 m, 40°19'44"N 07°36'08"O, *M. Vivas* & *A. Lumbreras*, 26-03-2009 (MAF-16712). – MÉXICO: Volcán Iztaccíhuatl, Morrena del Glaciar Ayoloco, 4687 m, 19°09'58"N 98°28'46"O, *B. Roca-Valiente*, 04-XI-2008 (MAF-17652, MAF-17653, MAF-17656); Subida al volcán, 4400 m, 19°09'1"N 98°38'37"O, *B. Roca-Valiente*, 05-XI-2008 (MAF-17658). – NUEVA ZELANDA: Styx Creek, Central Otago, 1100 m, 45°28'S 169°58'E, *M. Vivas*, 02-II-2011 (MAF-17707).

“Talo areolado disperso o parcialmente continuo. Areolas de 0.2-1 mm de diámetro planas o ligeramente convexas, de color verde, desnuda, opaca, KOH-, Pd + amarillo fuerte, I+ azul pálido o casi I-. Protalo bien desarrollado. Apotecios situados entre las areolas, de 0.2-0.5 mm de diámetro, negros y planos o cóncavos, ligeramente marginados. Himenio pálido de 160 µm de espesor. Epitecio marrón oscuro KOH-. Las esporas son grandes, oblongas a elípticas, murales, pluricelulares con 5-7 septos, de color marrón-negro (36-53 x 16-21 µm).”

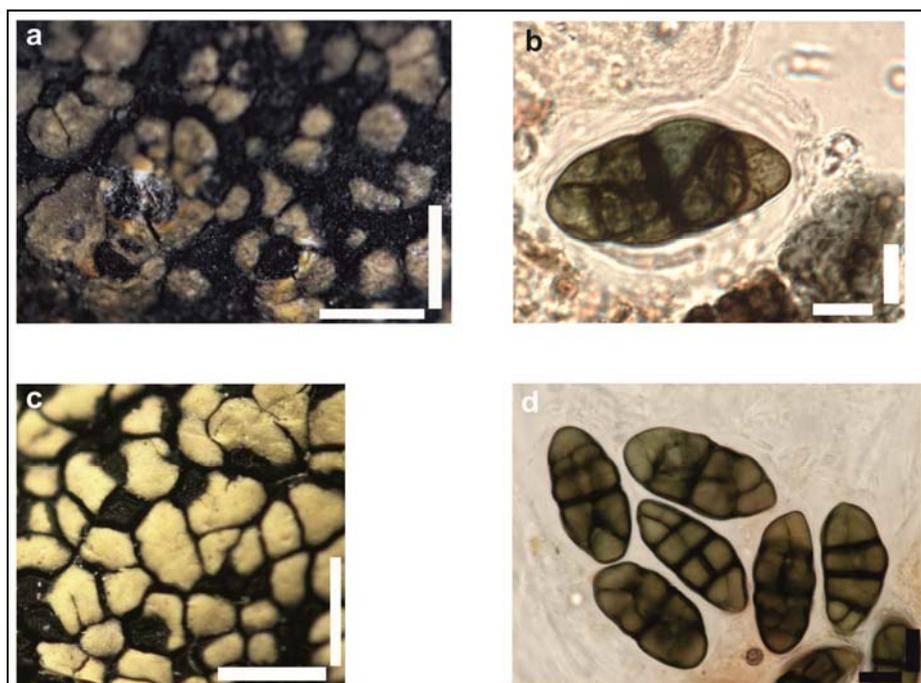


Figura 1.11.-*R. riparium* subsp. *lindsayanum*. Especie tipo: *R. lindsayanum* H-9502545 (a y b). Material propio: *R. geographicum* subsp. *lindsayanum* MAF-16638 (c) MAF-17658 (d). Escala: a y c= 1 mm, b y d= 10 µm.

Rhizocarpon riparium (Räs.) subsp. *riparium*, *Ann. Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn.* “Vanamo”

16, Not. 12: 60 (1942a)

Tipo: Rusia, Vaitolahti. Leg. V. Räsänen, 10-VI-1931 (Isotipo H-9 502 857!, H sub. *Rhizocarpon riparium* (Räs.) var. *typica* Räs., *Rhizocarpon lindsayanum* subsp. *kittilense* Runem., *Rhizocarpon geographicum* subsp. *kittilense* (Räs.) Ahti).

Materiales estudiados: – ESPAÑA: Madrid, Sierra de Guadarrama, Pico de la Najarra, 2020 m, 40°49'15"N 03°49'48"O, *Roca-Valiente & S. Pérez Ortega*, 25-X-2007 (MAF-16636, MAF-16639); Segovia, Sierra de Somosierra-Sierra de Ayllón, Pico del Lobo, 2190 m, 41°11'32"N 03°27'57"O, *B. Roca-Valiente & S. Pérez Ortega*, 01-XI-2007 (MAF-16694, MAF-16696). – ESTADOS UNIDOS: Alaska, Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway, 1079 m, 59°37'N 135°09'O, *S. Pérez-Ortega*, 31-VII-2009 (MAF-17639). – CHILE: Tierra de Fuego, Parque Nacional de Pali Aike, 195 m, 52°05'S 69°42'O, *S. Pérez-Ortega*, 12-I-2008 (MAF-17678).

“Talo en parte (margen) areolado contiguo y parte (por lo general hacia el centro) areolado disperso, liso y pulido, agrietado, esorediado y epapilado, desnudo, amarillo-verdoso, KOH-, Pd-, I+ azul intenso. Protalo negro. Apotecio de 0.5 mm de diámetro, inmerso en el talo o entre las areolas, irregularmente circular o angular, negro, opaco, desnudo, plano, marginado o al principio casi in-marginado. Himenio de 150 μ m de espesor, de color oxido, KOH-. Epitecio marrón KOH-. Hipotecio marrón-negruczo, KOH+ ligeramente rojizo. Esporas marrón-negruczo, murales con 5 septos, oblongas, grandes (26-42 x 13-19 μ m).”

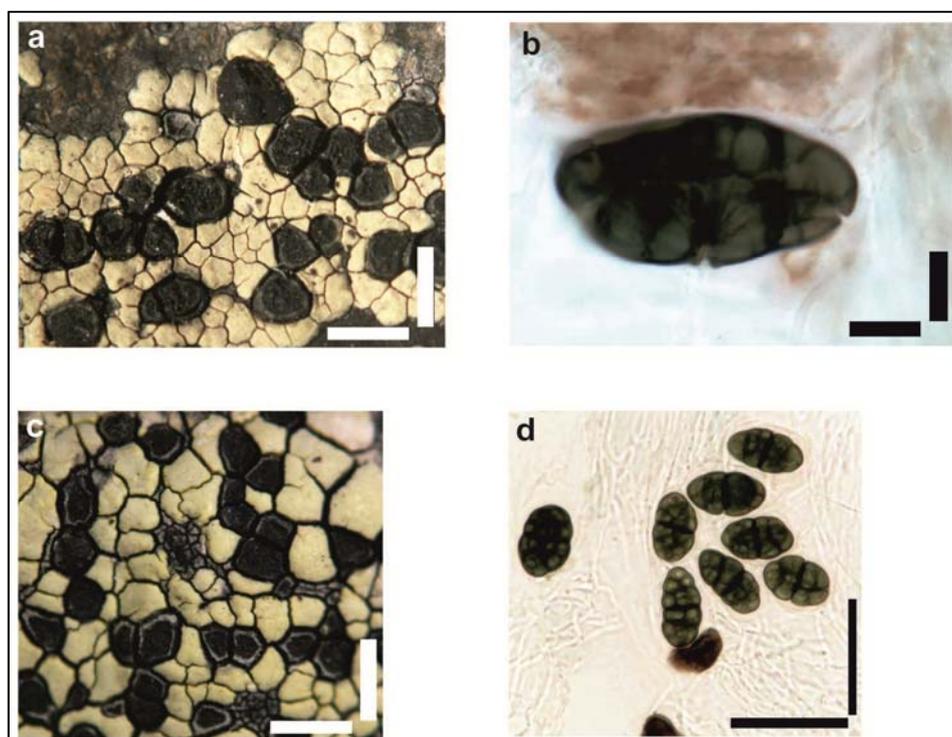


Figura 1.12.-*R. riparium* subsp. *riparium*. Especie tipo: *R. riparium* H-9502857 (a y b). Material propio: *R. riparium* subsp. *riparium* MAF-16636 (c) MAF-17678 (d). Escala: a y c= 1 mm, b= 10 μ m y d=100 μ m.

Rhizocarpon saanaëense Räs., *Ann. Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn. "Vanamo"* 16, Not.

12: 61 (1942a)

Tipo: Finlandia, Enontekiö Saanaavaara. Leg. *J. P. Norlin*, 1867. (Holotipo H-9 502 520!, H sub. *Lecidea geographica* L.).

Materiales estudiados: – ESPAÑA; Huesca, Pre Pirineo, Sierra de Guara, 890 m, 42°29'22"N 0°16'58"O, *S. García Catalá & J. C. Zamora*, 10-X-2009 (MAF-16714). – ESTADOS UNIDOS: Alaska, Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway, 948 m, 59°36'N 135°08'O, *S. Pérez-Ortega*, 01-VIII-2008 (MAF-17641).

“Talo pequeño de 0.5-1 cm, sub-orbicular amplio, crustáceo, a trozos areolado, margen muy marcado, ver amarillento, en el centro de color blanco o blanquecino-amarillento. Areolas planas o irregulares, desnudas, de 0.1-0.3 mm de diámetro. KOH-, Pd- e I+ azul. Protalo negro circundante. Apotecio comunes, circulares, ente las areolas, planos y negros, desnudos, débilmente marginado o in-marginado, de 0.2-0.3 mm de diámetro. Epitecio marrón oscuro, KOH+ morado intenso. Himenio espeso, hialino. Hipotecio marrón oscuro a negro, KOH+ de color rojo. Esporas marrones oscuras o marrones-negras, murales con 3-5 septos, con numerosas células (21-29 x 8-12 μ m), de forma oblonga o elipsoide. Paráfisis en KOH libres, ramificadas-conectadas.”

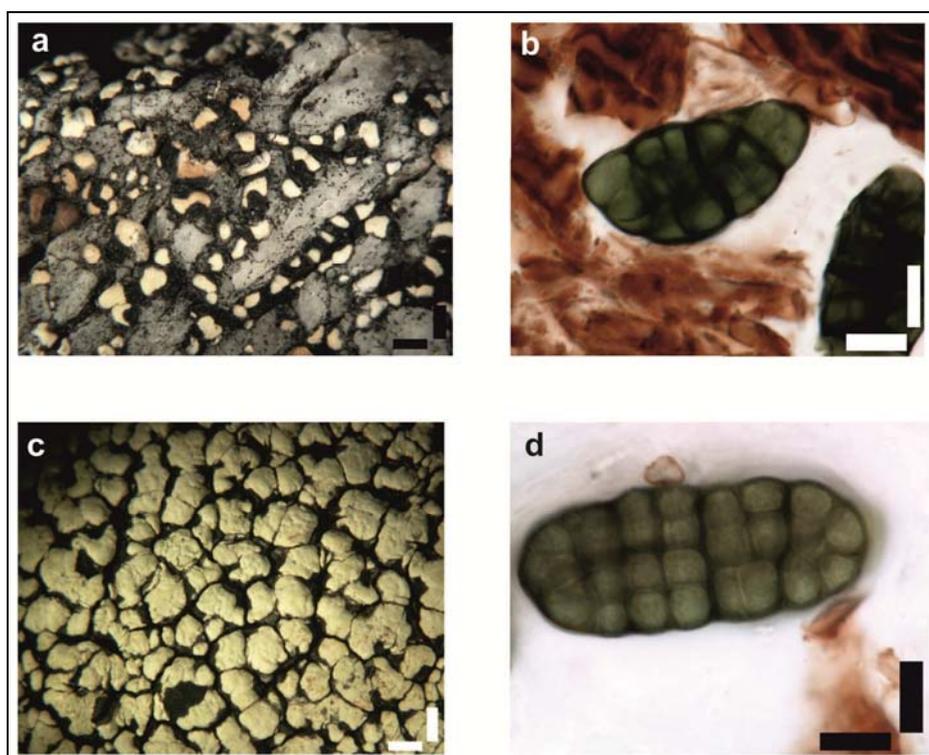


Figura 1.13.-*R. saanaëense*. Especie tipo: *R. saanaëense* H-9502520 (a y b). Material propio: *R. saanaëense* MAF-16714 (c y d). Escala: a y c= 1 mm, b y d= 10 μ m.

Rhizocarpon sphaerosporum Räs. *Ann. Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn. "Vanamo" 19*, Not. 14: 6 (1944)

Tipo: Suecia, Uppsala, Gottsunda. Leg. *E. Pärsson*, 1893 (Isotipo L-571!, S sub. *Rhizocarpon lecanorinum* var. *cyclica* (Nyl.), *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC.).

Materiales estudiados: – ESPAÑA: Madrid, Sierra de Guadarrama, Pico de la Najarra, 2020 m, 40°49'15"N 03°49'48"O, *B. Roca-Valiente* & *S. Pérez Ortega*, 25-X-2007 (MAF-16643, MAF-16645); Ávila, Sierra de Gredos, Plataforma de Gredos, Los Barrerones, 2190 m, 40°16'13"N 05°15'39"O, *B. Roca-Valiente*, 02-V-2008 (MAF-16664); Granada, Sierra Nevada, Observatorio de Mohón del Trigo, 2576 m, 37°05'28"N 03°23'02"O, *B. Roca-Valiente* & *G. Amo*, 13-VI-2008 (MAF-16684); Segovia, Sierra de Somosierra-Sierra de Ayllón, Pico del Lobo, 2190 m, 41°11'32"N 03°27'57"O, *B. Roca-Valiente* & *S. Pérez Ortega*, 01-XI-2007 (MAF-16691); Lérida, Pirineos, Parque nacional de Aigüestortes, 2570 m, 42°36'29"N 0°53'15"O, *B. Roca-Valiente*, 14-VII-2009 (MAF-16720, MAF-16728). – PORTUGAL: Sierra de Estrella, 1930 m, 40°19'44"N 07°36'08"O, *M. Vivas* & *A. Lumbreras*, 26-III-2009 (MAF-16710). – ESTADOS UNIDOS: California, Sequoia National Park, 2100 m, 36°37'N 118°49'O, *G. Amo de Paz*, 23-VII-2008 (MAF-17650). – INDIA: Uttaranchal, Badhrinath, en el camino de Manas a las Cataratas de Vasundhara, 3600 m, 30°47'40"N 79°29'32"E, *P. K. Divakar*, 02-VIII-2007 (MAF-17731, MAF-17734).

“Talo uniforme, crustáceo areolado disperso, verde, KOH-, PD+ amarillo, I+ azul. Protalo bien desarrollado, grueso, negro. Areolas gruesas, convexas, hinchadas, circulares o semicirculares, desnudas, opacas, de 0.4-0.8 mm de diámetro. Apotecios frecuentes, entre las areolas, negros, planos o cóncavos, angulares o sub-orbicular, con margen grueso, de 0.4-1 mm de diámetro. Himenio de 160-200 μ m de espesor, pálido o hialino. Epitecio estrecho, de color verde oliva a marrón, KOH-. Hipotecio marrón oscuro, KOH-. Excípulo rojizo, KOH+ rojo pálido. Esporas; se pueden encontrar dos, cuatro o seis por asco, de color marrón oscuro-negro o casi negras, murales (con numerosas células), esferoides (17-24 (27) μ m) o raramente ovoides (27.5 x 21 μ m).”

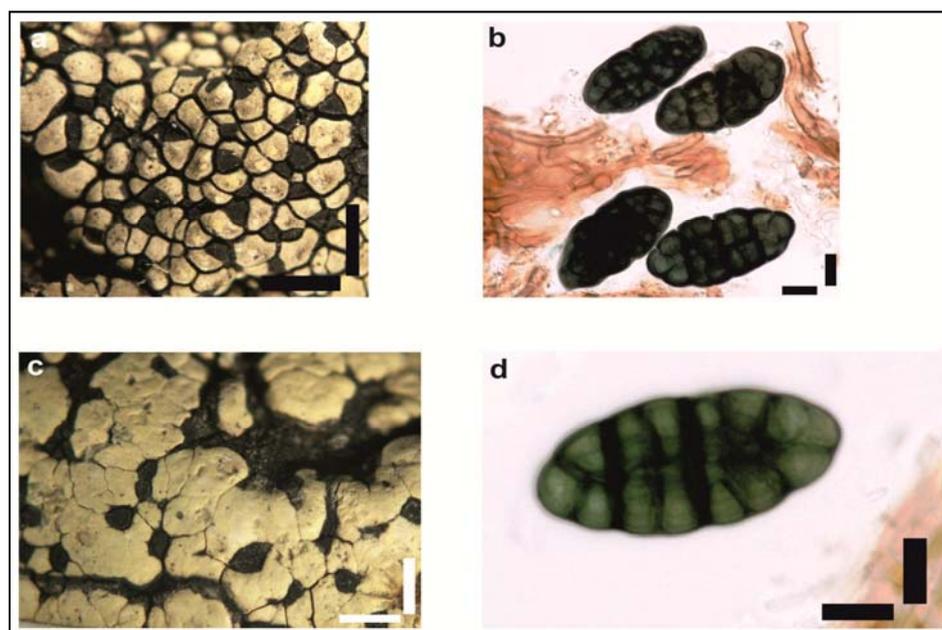


Figura 1.14.-*R. sphaerosporum*. Especie tipo: *R. sphaerosporum* L-571 (a y b). Material propio: *R. sphaerosporum* MAF-16728 (c y d). Escala: a y c= 1 mm, b y d= 10 μ m.

Rhizocarpon sublucidum Räs., *Ann. Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn. "Vanamo"* 21: 3(1947)

Tipo: Suiza, Les Mosses. Leg. E. A. Vainio, 1882. (Isotipo H-9 502 642! H).

Materiales estudiados: – España: Madrid, Sierra de Guadarrama, Pico de la Najarra, 2020 m, 40°49'15"N 03°49'48"O, B. Roca-Valiente & S. Pérez Ortega, 25-X-2007 (MAF-16639); Ávila, Sierra de Gredos, Plataforma de Gredos, Los Barrerones, 2190 m, 40°16'13"N 05°15'39"O, B. Roca-Valiente, 02-V-2008 (MAF-16655, MAF-16657, MAF-16660, MAF-16661, MAF-16669); Granada, Sierra Nevada, Observatorio de Mohón del Trigo, 2576 m, 37°05'28"N 03°23'02"O, B. Roca-Valiente & G. Amo, 13-VI-2008 (MAF-16680, MAF-16688); Salamanca, Sierra de Francia, Peña de Francia, 1723 m, 40°30'54"N 06°10'08"O, B. Roca-Valiente 05-VI-2009 (MAF-16734); Huesca, Pre Pirineo, 890 m, 42°29'22"N 0°16'58"O, S. García Catalá & J. C. Zamora, 10-X-2009 (MAF-16881); Is. Gran Canaria, Valleseco, 1305 m, 28°01'30"N 15°35'55"O, A. Crespo, 18-06-2009 (MAF-17631). – PORTUGAL: Sierra de Estrella, 1930 m, 40°19'44"N 07°36'08"O, M. Vivas & A. Lumbreras, 26-III-2009 (MAF-16707). – CHILE: Región del Maule, Paso de Pino Hachado, 1987 m, 38°39'27"S 70°53'47"O, S. Pérez-Ortega & F. Fdez.-Mendoza, 01-IV-2009 (MAF-17671). – CHILE: Región de la Araucanía Pucón, Volcán Villarica, 1593 m, 39°23'51"S 71°56'45"O, S. Pérez-Ortega & F. Fdez.-Mendoza, 31-III-2009 (MAF-17665). – ANTÁRTIDA: Is. Livingston, Caleta Española, 25 m, 62°39'S 60°23'O, P. Raggio, 05-I-2009 (MAF-17696). – MÉXICO: Volcán Iztaccíhuatl, subida al volcán, 4400 m, 19°09'1"N 98°38'37"O, B. Roca-Valiente, 05-XI-2008 (MAF-17663). – TAIWAN: Pico Monte Nanhu, 3712 m, 24°21'38"N 121°26'27"E, Y. Ohmura, 03-X-2010 (MAF-17723, MAF-17724). – INDIA: Uttaranchal, Badhrinath, en el camino de Manas a las Cataratas de Vasundhara, 3600 m, 30°47'40"N 79°29'32"E, P. K. Divakar, 02-VIII-2007 (MAF-17732, MAF-17733, MAF-17738).

“Talo crustáceo, espeso, continuo, agrietado o casi sin fisuras, liso, extenso y epruinoso. Protalo visible forma margen talino, de color negro. Apotecios frecuentes inmersos en el talo o al nivel de este, son de color negro, desnudos, con forma asteroidea o irregularmente angular, no circulares, planos 0.2-0.5 mm de diámetro. Himenio de 200 µm de espesor, de color sub-oxidado u oliváceo o hialino. Epitecio parduzco KOH + rojizo. Hipotecio espeso de color marrón oscuro-negro, KOH-. Esporas; 8 por asco, de color marrón oscuro-negras, murales, ovoides, oblongas o elipsoides, (3) 5-7 septos por espóra (22-53 x 15-22 µm).”

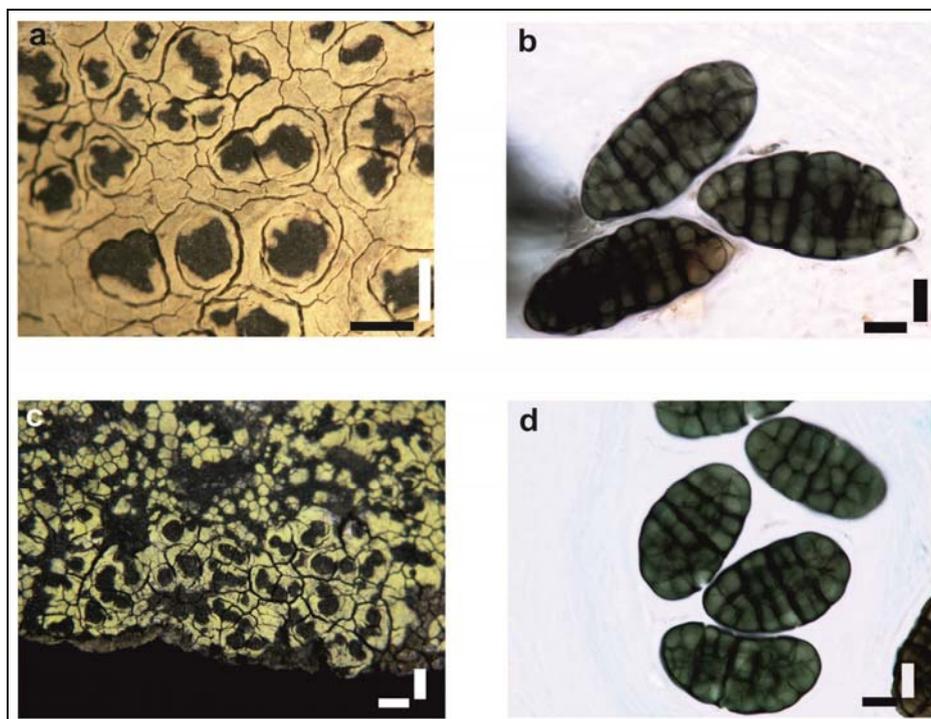


Figura 1.15.-*R. sublucidum*. Especie tipo: *R. sublucidum* H-9502642 (a y b). Material propio: *R. sublucidum* MAF-17696 (c) MAF-17665 (d). Escala: a y c= 1 mm, b y d= 10 µm.

Rhizocarpon tavaresii Räs., *Lichenes Novi* IV Ann. Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn. "Vanamo" III: 85 (1949b)

Tipo: Portugal, Minho, Serra do Gerez-Onteiro Moço. Leg. C. N. Tavares, 19-VI-1947. (Holotipo H-9502641! H).

Materiales estudiados: – ESPAÑA: Ciudad Real, Solana del Pino, 981 m, 38°28'59"N 04°06'54"O, S. Pérez Ortega, 25-VIII-2008 (MAF-16653); Ávila, Sierra de Gredos, Plataforma de Gredos, Los Barrerones, 2190 m, 40°16'13"N 05°15'39"O, B. Roca-Valiente, 02-V-2008 (MAF-16658); Granada, Sierra Nevada, Observatorio de Mohón del Trigo, 2576 m, 37°05'28"N 03°23'02"O, B. Roca-Valiente & G. Amo, 13-VI-2008 (MAF-16679, MAF-16686); Lérida, Pirineos, Parque Nacional de Aigüestortes, 2570 m, 42°36'29"N 0°53'15"O, B. Roca-Valiente, 14-VII-2009 (MAF-16727); Salamanca, Sierra de Francia, Peña de Francia, 1723 m, 40°30'54"N 06°10'08"O, B. Roca-Valiente 05-VI-2009 (MAF-16735); Is. La Palma, Subida al Refugio del Pilar, 1103 m, 28°38'N 17°38'O, G. Amode Paz, 25-VIII-2009 (MAF-17624). – PORTUGAL: Sierra de Estrella, 1930 m, 40°19'44"N 07°36'08"O, M. Vivas & A. Lumbreras, 26-III-2009 (MAF-16704, MAF-16708). – ESTADOS UNIDOS: Alaska, Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway, 935 m, 59°36'N 135°08'O, S. Pérez-Ortega, 01-VIII-2008 (MAF-17638). – ANTÁRTIDA: Is. Livingston, Caleta Española, 25 m, 62°39'S 60°23'O, P. Raggio, 05-I-2009 (MAF-17697). – INDIA: Uttaranchal, Badhrinath, en el camino de Manas a las Cataratas de Vasundhara, 3600 m, 30°47'40"N 79°29'32"E, P. K. Divakar, 02-VIII-2007 (MAF-17735). – MÉXICO: Volcán Iztaccíhuatl, subida al volcán, 4400 m, 19°09'1"N 98°38'37"O, B. Roca-Valiente, 05-XI-2008 (MAF-17661). – TAIWAN: Subida al Monte Nanhu, 3175 m, 24°22'52"N 121°25'15"E, Y. Ohmura, 01-X-2010 (MAF-17725).

“Talo crustáceo, areolado disperso, esorediado, KOH-, Pd+ ocráceo amarillo, I+ azul. Areola plana, desnuda, angulosas, pequeñas, de 0.1-0.6 mm de diámetro, delgadas de color verdoso-amarillo, opacas o sub-nítidas, lisas y pulidas. Apotecio de 0.2-0.5 de diámetro, se encuentra entre las areolas, planos, desnudo, angular, negro, débilmente marginado. Himenio ligeramente espeso 65-80 µm, de color oliváceo o casi de color cian. Epitecio KOH+ color óxido. Esporas; se encuentran 8 por asco, de color marrón oscuro negro o casi intraslucidas, oblongas, murales con 3-5 septos (25-35(40) x 13-16 µm).”

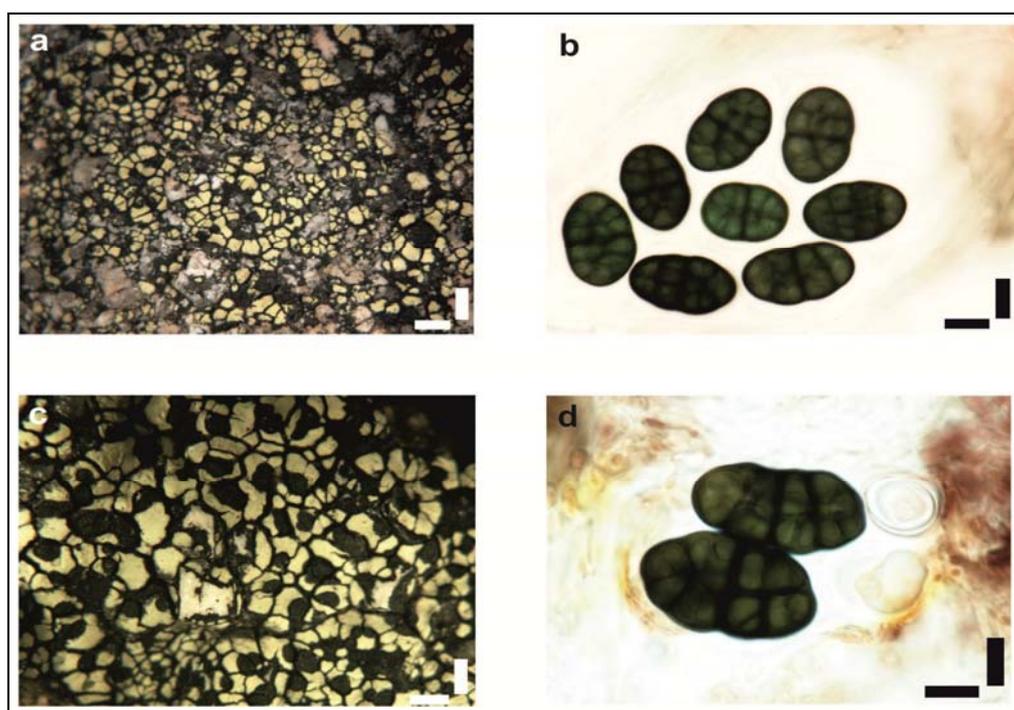


Figura 1.16.-*R. tavaresii*. Especie tipo: *R. tavaresii* H-9502640 (a y b). Material propio: *R. tavaresii* MAF-16704 (c) MAF-17624 (d). Escala: a y c= 1 mm, b y d= 10 µm.

Rhizocarpon tinei (Tornab.) Runem. *Opera Bot.* 2 (1): 118 (1956a)

Basion.: *Lecidea tinei* Tornab., *Lichenographia Sicula*: 17 (1848).

Tipo: Italia, Sicilia, Etna. Leg. *F. Tornabene* (Lectotipo, CAT).

Materiales estudiados: – ESPAÑA: Madrid, Sierra de Guadarrama, Pico de la Najarra, 2020 m, 40°49'15"N 03°49'48"O, *B. Roca-Valiente* & *S. Pérez Ortega*, 25-X-2007 (MAF-16642, MAF-16649); Ávila, Sierra de Gredos, Plataforma de Gredos, Los Barrerones, 2190 m, 40°16'13"N 05°15'39"O, *B. Roca-Valiente*, 02-V-2008 (MAF-16654); Granada, Sierra Nevada, Observatorio de Mohón del Trigo, 2576 m, 37°05'28"N 03°23'02"O, *B. Roca-Valiente* & *G. Amo*, 13-VI-2008 (MAF-16685, MAF-16687); Segovia, Sierra de Somosierra-Sierra de Ayllón, Pico del Lobo, 2190 m, 41°11'32"N 03°27'57"O, *B. Roca-Valiente* & *S. Pérez Ortega*, 01-XI-2007 (MAF-16693, MAF16695, MAF-16697); Lérida, Pirineos, Parque Nacional de Aigüestortes, 2570 m, 42°36'29"N 0°53'15"O, *B. Roca-Valiente*, 14-VII-2009 (MAF-16717); Salamanca, Sierra de Francia, Peña de Francia, 1723 m, 40°30'54"N 06°10'08"O, *B. Roca-Valiente*, 05-VI-2009 (MAF-16729, MAF-16739); Is. La Palma, Subida al Refugio del Pilar, 1103 m, 28°38'N 17°38'O, *G. Amode Paz*, 25-VIII-2009 (MAF-17623, MAF-17625); Is. La Palma, Carretera al Roque, pasado el cruce al Pico de la Nieve, 1993 m, 28°44'33"N 17°49'37"O, *A. Crespo*, 25-VI-2009 (MAF-17628). – PORTUGAL: Sierra de Estrella, 1930 m, 40°19'44"N 07°36'08"O, *M. Vivas* & *A. Lumbreras*, 26-III-2009 (MAF-16706). – ANTÁRTIDA: Is. Livingston, Caleta Española, 25 m, 62°39'S 60°23'O, *P. Raggio*, 05-I-2009 (MAF-17698). – NORUEGA: Is. Svalbard, Longyearbyen, 63 m, 78°13'N 15°36'E, *L.G. Sancho* & *A. Pintado*, 27-VI-2007 (MAF-17605); nevero próximo al Hotel Svalbard, 86 m, 78°12'N 15°37'E, *L. G. Sancho* & *A. Pintado* 26-VI-2007 (MAF-17608). – REINO UNIDO: Escocia, Is. Skye, 70 m, 57°12'55"N 05°50'19"O, *F. Fdez.-Mendoza*, *S. Pérez-Ortega* & *M. Vivas*, 10-VIII-2010 (MAF-17617, MAF-17620). – ESTADOS UNIDOS: Alaska: Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway, 1019 m, 59°37'N 135°09'O, *S. Pérez-Ortega*, 30-VII-2008 (MAF-17634, MAF-17643). – MÉXICO: Volcán Iztaccihuatl, Morrena del Glaciar Ayoloco, 4687 m, 19°09'58"N 98°28'46"W, *B. Roca-Valiente*, 04-XI-2008 (MAF-17654); Subida al volcán, 4400 m, 19°09'1"N 98°38'37"O, *B. Roca-Valiente* 05-XI-2008 (MAF-17660). – CHILE: Región del Maule, Paso de Pino Hachado, 1987 m, 38°39'27"S 70°53'47"O, *S. Pérez-Ortega* & *F. Fdez.-Mendoza*, 01-IV-2009 (MAF-17672); Tierra de Fuego, Lago Balmaceda, 138 m, 51°56'29"S 72°23'17"O, *S. Pérez-Ortega*, 14-I-2008 (MAF-17676); Tierra de Fuego, Islotos Holger, 0 m, 54°56'28"S 67°15'03"O, *S. Pérez-Ortega*, 22-I-2008 (MAF-17681, MAF-17682); Tierra de Fuego, Is. Pickton, 0 m, 54°55'48"S 67°03'11"O, *S. Pérez-Ortega*, 23-I-2008 (MAF-17687); Tierra de Fuego, Puerto Navarino frente a la Is. Hoste, 0 m, 54°55'48"S 68°20'45"O, *S. Pérez-Ortega*, 27-I-2008 (MAF-17686). – NUEVA ZELANDA: Styx Creek, Central Otajo, 1100 m 45°28'S 169°58'E, *M. Vivas*, 02-II-2011 (MAF-17709, MAF-17714). – TAIWAN: Pico Monte Nanhu, 3712 m, 24°21'38"N 121°26'27"E, *Y. Ohmura*, 03-X-2010 (MAF-17721); Subida al Monte Nanhu, 3175 m, 24°22'52"N 121°25'15"E, *Y. Ohmura*, 01-X-2010 (MAF-17729).

“Talo crustáceo areolado de color verdoso-amarillo. Areolas esquamulosas y aplanadas que aparecen en gran número, a menudo unidas. Hipotalo como una cubierta negra interrumpida. Apotecio negro innato, raramente al nivel horizontal del resto del talo, nunca emergido; excípulo carbonaceo marginado prominente o liso, disco desnudo plano. Esporas (Runemark 1956a); muriformes con pocos o muchos septos (20-40 x 10-22 μ m).”

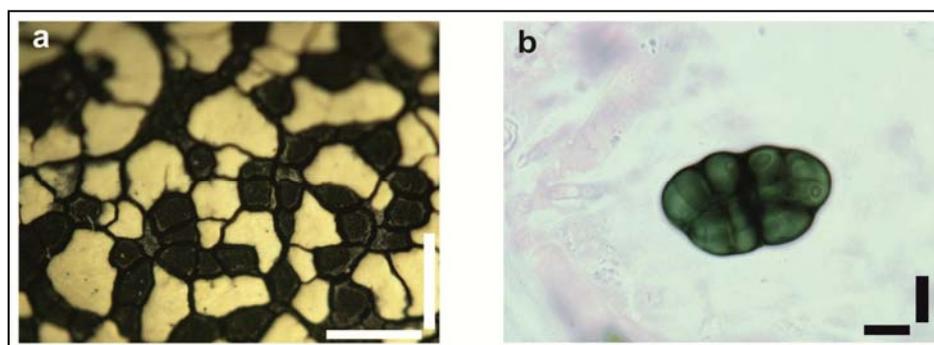


Figura 1.17.-*R. tinei*. Material propio: *R. tinei* MAF-16654 (a y b) Escala: a= 1 mm, b= 10 μ m.

DISCUSIÓN

La revisión de los tipos y su comparación con las descripciones originales y con los materiales propios han ayudado a entender mejor la enorme plasticidad fenotípica de las especies y subespecies descritas en el grupo de *Rhizocarpon geographicum*. Tal es esta que en algunos casos se han detectado incongruencias con las descripciones originales y con las claves más utilizadas para la identificación de los individuos del grupo.

Con respecto a las reacciones químicas al Pd en la médula y a la KOH en el epihimeno no se constata total precisión o congruencia entre los tipos y las descripciones de las especies de floras y revisiones posteriores. Por ejemplo, el espécimen tipo de *R. prospectans* es KOH- (al menos en los apotecios estudiados), según la descripción de la especie es KOH- o + tornándose a ligeramente violeta, sin embargo en la clave de Poelt (1988) aparece únicamente como KOH+, lo que puede conducir a error en la identificación del material. Del mismo modo, la descripción de *R. ferax* dice que su epitecio reacciona KOH+ color oliva, sin embargo en nuestras observaciones se vio que simplemente se intensificaba el color verde del himenio y del epitecio, no pudiendo considerarse esto como una reacción positiva a la potasa, apareciendo como KOH- también en la clave dicotómica de Poelt (1988). En las observaciones del espécimen tipo de *R. tavaresii* ocurría algo similar: se cortaron 2 apotecios distintos, uno de ellos dio reacción KOH+ del epitecio de color rojo-violeta débil y el otro KOH-, según la descripción de la especie la reacción debería ser KOH+ de color oxido y en la clave de Poelt (1988) aparece tanto como KOH- o como + rojo-violeta.

La reacción positiva al Pd de la médula es únicamente relevante en la diferenciación entre *R. lecanorinum* y *R. drepanodes* o *R. ferax* (Poelt 1988). *Rhizocarpon. lecanorinum* fue descrito como Pd-, sin embargo en la revisión del tipo se observó que era Pd+ de color rojo teja pálido-anaranjado. En la clave de Poelt (1988) *R. lecanorinum* aparece como Pd+ rojo, diferenciándolo así de *R. drepanodes* y *R. ferax*, que se suponen Pd+ amarillo. Los tipos de *R. drepanodes* y *R. ferax* reaccionaron fuertemente al Pd dando un color más cercano al naranja que al amarillo, al contrario de lo que indicaban sus descripciones: *R. drepanodes* fue descrito como Pd+ amarillo y *R. ferax* como Pd-. Se comprobó también en el tipo de *R. saanaense* que mostró una reacción PD-, ya que según la clave de Poelt (1988) puede ser PD+ rojo/violeta o -. En el resto de especies tipo revisadas no se consideró este carácter por tratarse de un carácter con poco peso en la identificación de las especies y subespecies.

Si atendemos a la clave de Poelt (1988) y a las distintas descripciones de las especies y subespecies (Anders 1923; Räsänen 1942a y b, 1943b, 1944, 1947, 1949b; Runemark 1956a; Feuerer 1978 etc.), donde la mayoría de los individuos aparecen como Pd+ amarillo o Pd-.

Parece que las reacciones químicas a ambos reactivos pudieran ser poco fiables e incongruentes incluso entre los especímenes tipo y las descripciones originales de las especies y subespecies.

Por otro lado, las areolas en forma de collar, ha sido uno de los caracteres más relevantes en el estudio del grupo de *R. geographicum* (Runemark 1956a; Thomson 1967; Feuerer 1978; Poelt 1988; etc.): se observó que los tipos de *R. diabasicum*, *R. drepanodes*, *R. ferax*, *R. lecanorinum*, *R. lindsayanum*, *R. macrosporum*, *R. prospectans*, *R. saanaënse*, *R. sphaerosporum*, *R. sublucidum* y *R. tavaresii* presentaban areolas en forma de collar. Sin embargo de todas estas especies sólo *R. drepanodes*, *R. ferax*, *R. lecanorinum*, *R. sphaerosporum* y *R. tavaresii* aparecen con areolas en forma de collar en las claves dicotómicas más relevantes, el resto se supone que carecen de ellas o ni si quiera se indica sí podrían o no tener este tipo de areolas, pudiendo conducir a errores en la identificación (Runemark 1956a; Poelt 1988).

Llama la atención también el caso de *R. geographicum* subsp. *geographicum*: Runemark sinonimizó *R. tinei* subsp. *vulgare* (1956a) con *R. semilecanorinum*, incluso revisó el tipo de esta última y lo re-nombra como *R. tinei* subsp. *vulgare* ya que parecen no tener demasiados caracteres en común: Runemark (1956a) dice de *R. tinei* subsp. *vulgare* que sus areolas son planas y los apotecios estrictamente angulares, mientras que Räsänen describe la especie con areolas hinchadas y los apotecios ocelados. Además las ascósporas de *R. semilecanorinum* son ligeramente más grandes (24-32 x 13-16 µm, 14 células de media por ascóspora) que las ascósporas observadas por Runemark (1956a) en *R. tinei* subsp. *vulgare* (20-32 x 10-15 µm) y Poelt (1988) para *R. geographicum* subsp. *geographicum* (20-32 x 10-15 µm, pocas células por espora, entre 6 y 13).

Tal como venimos señalando, en ciertos casos se aprecia falta de congruencia entre algunas de las descripciones de las especies y subespecies (p. ej. en *R. saanaëense*) y los especímenes que en autor da como tipo. Esto, unido a la ambigüedad producida por la variabilidad fenotípica que presentan en general los individuos del grupo, pone de manifiesto la necesidad de una reevaluación de los caracteres anatómicos y químicos utilizados tradicionalmente en la descripción de las especies y subespecies del grupo.

El análisis en profundidad de dichos caracteres y su comparación con la filogenia del grupo se estudiará en los capítulos siguientes, especialmente en los Capítulos 2 y 5.

**CAPÍTULO 2: Variabilidad Genética y Morfológica del grupo
de *Rhizocarpon geographicum* en la Península Ibérica**

**CHAPTER 2: Genetic and Morphologic Variability in the
Rhizocarpon geographicum group from
the Iberian Peninsula**



ABSTRACT

INTRODUCTION

The *Rhizocarpon geographicum* group currently includes around 26 yellow pigmented species with I+ blue reacting medulla and muriform ascospores. The taxonomy of the group has just suffered minor changes during the last 50 years. However, species delimitation within the group is still a highly problematic issue because the taxa are very variable. In fact, specialists described many species though recognizing that the group needs a deep revision. We studied the inter and intraspecific variability in the *R. geographicum* group using the results from two sets of characters: anatomic-morphological and chemical- and molecular characters. We compared the results with a possible geographic pattern in Iberian Peninsula.

MATERIAL AND METHODS

Specimens from alpine zone (7 localities) were studied together with samples from low altitude (5 localities) to include all the species of the group in The Iberian Peninsula -Fig. 2.1-. We collected 100 individual of 14 taxa, the locations abbreviations and details of collectors and herbarium codes for taxa sampling are included in Table 2.1 and Table 2.2.

Firstly, the individual were identified according to the keys of the group. Macro-morphological characters were observed under dissecting microscope. Chemical characters were performed by spot test for Pd and I medulla reactions, epihymenium reaction to KOH was observed under light microscopy and thin-layer chromatography (TLC) using standard methods. Micro-morphological characters, as apothecia and ascospores characterization, were observed under light microscopy on hand-cut sections mounted in water, microscopic measurements were made at x1000 magnification in water -Table 2.4-. A total of 28 characters were studied, the arithmetic averages of every quantitative character were used in statistics analyses.

We compared information obtained from morphological and chemical characters with molecular data obtained from the nuITS and mtLSU rDNA regions of 100 specimens. Phylogenetic inference was performed using maximum parsimony (bootstrap $\geq 70\%$) analysis and bayesian (MC)³ tree sampling (pp ≥ 0.95). Extraction, amplification, sequencing and alignment specifications were described in General Methods.

Qualitative morphological and chemical characters were compared directly with phylogenetic trees and appearance percentage of each character was calculated for each phylogenetic lineage.

Quantitative morphological characters were analysed using descriptive statistics: tested by Pearson correlation and t-student (p-value ≤ 0.05 significant) and were illustrated by box-plots graphics (by SAS v. 9.1 and Statgraphics Plus v. 4.1).

Cluster analysis by SPAD v. 5.6 software was used to find possible relations with every morphological character and we contrasted the results with the lineages detected. We choose the cluster with more significant p-value for χ^2 . Discriminant approach (SAS v. 9.1 software) establishes if there are significant differences between the groups (phylogenetic lineages) and what variables (morphological characters) explain them. This analysis also gives us the probability of any individual to belong to each group according to its discriminant characters.

RESULTS AND DISCUSSION

All the specimens studied from the *R. geographicum* group formed a monophyletic clade, supported by high bootstrap and posterior probability -Fig. 2.2-. We suggest that the genus *Rhizocarpon* needs a thorough revision based on both morphological and molecular data: our results showed that *Superficiale* groups could be polyphyletic -Fig. 2.3-.

In the monophyletic clade gathering the *R. geographicum* group two lineages were detected and compared with the more important macro-morphological characters -Fig. 2.4.a and b- and with the chemical characters observed -Fig. 2.5.a and b-. In fact, critical morphological and chemical characters were distributed in different clades of the phylogenetic tree in both lineages. We considered also the geography (by colours in the figures) but we didn't find any geographic patterns. Species and subspecies included in the analysis showed polyphyletic patterns.

Descriptive statistics showed: epihymenium KOH+ reaction was more frequent in one of the lineages -Table 2.7-. According to Pearson correlation, hymenium height (AHim) is strongly correlated with apothecia height (AAp), and number of cells in ascospores (CSp) with ascospores length (LgSp) -Table 2.8-. Results from t-Student indicated that apothecia diameter (DAp), number of cells in the ascospores (CSp), ascospores length (LgSp), and width (AnSp) were significant, but it was impossible to characterize each of the lineages with clear measures due to overlap in them -Fig. 2.8 and Table 2.9-.

Cluster classification didn't provide a number of clusters according to the 14 species or to the phylogenetic lineages, and the percentage of appearances of anatomic characters in each cluster was low -Fig. 2.10.a and b, Tables 2.10, 2.11 and 2.12, Appendix 2-. Discriminant approach didn't support the phylogenetic lineages using morphological characters -Fig. 2.10.a and b, Tables 2.13 and 2.14, Appendix 2-. These results are due to strong variability of morphological characters used traditionally in the *R. geographicum* group.

Consequently, we reject to recognize the 14 taxa based in morphological characters. The lineages detected only could be described as species based on phylogenetic results; both lineages shared phenotypic, eco-geographic, and evolutionary data. It's necessary to increase taxa sampling including more localities with a worldwide distribution to support the results. So, we propose only one species which includes every taxa studied -Chapter 5-.

INTRODUCCIÓN

Rhizocarpon geographicum s. lat. es uno de los grupos de líquenes más fácilmente reconocibles, su color amarillo y su apariencia lo hacen inconfundible en prácticamente cualquier paisaje de alta montaña. Pero a pesar de ser tan característico, la identificación a nivel específico es complicada y en muchas ocasiones no es clara debido a la alta variabilidad de especies y subespecies que contiene el grupo y a la plasticidad de los caracteres anatómicos utilizados. El grupo de *R. geographicum* contiene 26 especies y subespecies (Poelt 1988) que se caracterizan por poseer ácido rhizocárpico, tener reacción positiva al lugol en su médula tornándose de color añil (I+), esporas muriformes, talos crustáceos saxícolas y que crecen predominantemente sobre sustratos ácidos de zonas alpinas y polares, con una amplia distribución mundial (Nylander 1884; Lynge 1932; Räsänen 1942a y b, 1949a; Runemark 1956b; Thomson 1967; Feuerer 1978; Poelt 1988; Asta y Letouit-Galinou 1995; Øvstedal y Smith 2001; Clayden 2004; Wirth *et al.* 2004).

Desde que Runemark en 1956 realizará un estudio exhaustivo de la taxonomía, distribución y ecología de las especies amarillas de *Rhizocarpon* en Europa, no se ha vuelto a estudiar en profundidad el grupo en la Península Ibérica, salvo el trabajo de Rico (1983) sobre la flora líquénica del Pico Lobo -Sistema Central- en el que se describían detalladamente las especies del grupo encontradas. Ya que la mayoría de las cumbres montañosas de la península son ácidas (granitos, gneis, cuarcitas etc.) y ofrecen la variabilidad y abundancia requerida en especies y subespecies de *Rhizocarpon geographicum* s. lat. (Sancho 1986; Barreno y Pérez-Ortega 2003; Vondrák y Etayo 2007), hacen de la Península Ibérica una localización ideal para abordar el estudio en profundidad del grupo y que éste pueda ser extrapolable a otras áreas geográficas del planeta.



Figura 2.0.a.- Zona de muestreo: Pico Lobo.

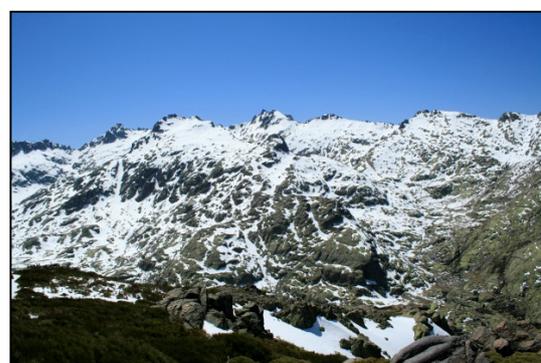


Figura 2.0.b.- Zona de muestreo: Sierra de Gredos, camino a Los Barrerones.

Tanto Thomson (1967) como Feuerer (1978, 1991), Poelt (1988), Wirth (1995) o Clayden (2004), consideran a *R. geographicum* s. lat. como una unidad muy variable que necesitaría una revisión en profundidad debido fundamentalmente a su variabilidad fenotípica. El estudio del grupo se ha basado tradicionalmente en el análisis de los caracteres anatómicos, como el tamaño y número de células de las ascósporas, carácter de especial importancia en la identificación de muchas de las especies y subespecies del grupo, el color y forma de las areolas o caracteres químicos (presencia de ácido psorómico, ácido estíctico etc.). En muchas ocasiones estos caracteres son ambiguos conduciendo a una identificación poco precisa o errónea (Poelt 1988).

La variación intra-específica del grupo de especies no ha quedado del todo clara en trabajos anteriores; Clayden (2004) en su tesis doctoral sobre los *Rhizocarpon* amarillos en el norte de Gales, concluye que la resolución del complejo pasa por realizar un estudio exhaustivo de los miembros del grupo utilizando técnicas moleculares, sin las cuales no parece posible clarificar la sistemática del complejo y del subgénero.

Ihlen y Ekman, en su trabajo del 2002, realizan un acercamiento molecular a algunas especies del grupo, en el que se pone de manifiesto que los caracteres anatómicos y químicos utilizados hasta ahora para delimitar los subgéneros de *Rhizocarpon*, como por ejemplo la presencia de ácido rhizocárpico y ácido estíctico o la septación de las esporas, han cambiado varias veces en el transcurso de la evolución de los taxones, definiendo el género como polifilético y poniendo en duda, a falta de más análisis, la validez de dichos caracteres.

Como ocurre en otros grupos de líquenes, la definición a nivel de especie se hace complicada por la escasez de caracteres morfológicos, que es aún menor en líquenes crustáceos (Muggia *et al.* 2008), así como por la fuerte variación de estos debido probablemente a la adaptación al medio en el que se desarrollan. El uso de técnicas moleculares para corroborar filogenéticamente la taxonomía en líquenes se ha convertido en una herramienta imprescindible para esclarecer y entender mejor la sistemática en los hongos liquenizados (Grube y Kroken 2000; Crespo *et al.* 2001; Argüello *et al.* 2007; Gueidan *et al.* 2009; Crespo y Pérez-Ortega 2009; Pérez-Ortega *et al.* 2010b, Lumbsch y Leavitt 2011 etc.).

Se ha tratado de aclarar pues, si dentro del grupo de *R. geographicum* existen varios taxones (especies) que pueden convivir en el mismo ambiente ecológico o escasos taxones con una gran plasticidad fenotípica resultante, posiblemente, de la adaptación de los individuos a micro-hábitats (John 1989). En este último caso la plasticidad o convergencia adaptativa habría conducido a los especialistas a la descripción de numerosas especies, subespecies y formas.

Se pretende observar y dilucidar el valor taxonómico de los caracteres que se han utilizado tradicionalmente en el estudio de *Rhizocarpon geographicum* s. lat. y contrastar los resultados de este análisis con los de la aplicación de marcadores filogenéticos:

-Estudio de los caracteres anatómicos (macro y micro-morfológicos) definidos por los diferentes especialistas en el grupo (Anders 1923; Räsänen 1942a y b, 1943b; 1944, 1949a y b; Runemark 1956a; Feuerer 1978; Poelt 1988), estudiando además otros caracteres no tenidos en cuenta por anteriores autores. Los caracteres químicos, utilizando el *spot test*, e identificando el metabolismo secundario de las distintas especies y subespecies mediante el uso de la Cromatografía en Capa Fina (TLC).

-Para detectar los grupos naturales se realizaron análisis filogenéticos de tipo bayesiano y máxima parsimonia del grupo en distintos loci (ITS nu y LSU mt) de los individuos en los que se estudiaron previamente sus caracteres anatómicos y químicos.

-Con los datos obtenidos del análisis de los caracteres anatómicos y químicos, se realizaron diversos análisis estadísticos para estimar las relaciones entre ellos y si existía congruencia entre dichos caracteres. Se contrastó con la propia delimitación morfológica de las especies, con la geografía de los individuos y con los resultados obtenidos del análisis filogenético.

MATERIAL Y MÉTODOS

Medio físico y material biológico

Se realizaron 5 muestreos en el Sistema Central de la Península Ibérica, extendiéndose el estudio más tarde a las principales cordilleras montañosas de la península (Cordillera Bética y Pirenaica). Estos 7 muestreos principales se realizaron por encima de los 1700 m. de altitud sobre sustratos ácidos y ambiente alpino y subalpino propio de zonas templadas, encontrándose todos dentro de los piso bioclimáticos Oro y Crio-mediterráneo (Rivas-Martínez 1987, 2010).

A cada muestreo principal se le dio un color diferente con el que se localizará fácilmente la localidad en el mapa de muestreo -Fig. 2.1- y en los árboles filogenéticos -Fig. 2.4 y 2.5-. El muestreo se completó con especies y subespecies recolectadas a altitudes más bajas por ser propias de ambientes menos alpinos; se realizaron 5 muestreos adicionales entre los 550 m. de altitud y los 1300 m. de altitud correspondientes a los pisos Supra y Meso-mediterráneo, que aparecen en negro en la Fig. 2.1 y posteriores (Rivas-Martínez 1983, 1987).

En total fueron realizados 12 muestreos en 12 localidades diferentes (Tabla 2.1), a los que se suma 1 muestreo en la Isla de El Hierro (Is. Canarias) del que se incluyeron individuos del grupo *Viridiatrum* para el análisis filogenético (Tabla 2.5). En total han sido estudiados 100 especímenes pertenecientes a 14 especies y subespecies del grupo de *R. geographicum*. Sin embargo debemos indicar que en la Península Ibérica hay citadas 16 especies y subespecies del grupo, pero *R. ferax* y *R. carpaticum* no han sido encontrados en ninguno de los 12 muestreos realizados y no se ha podido acceder a material de herbario susceptible de ser utilizado para estudios moleculares, por lo que no se han incluido (Tabla 2.2). Es bastante posible que dichas especies pueden haber sido pasadas por alto con facilidad por sus similitudes macro-morfológicas con otras especies, es probable también que las citas anteriores de dichas especies sean erróneas, ya que no son especies fáciles de identificar y no existen pliegos de estas en los herbarios consultados que confirmen dichas citas (MAF, MA y MACB).

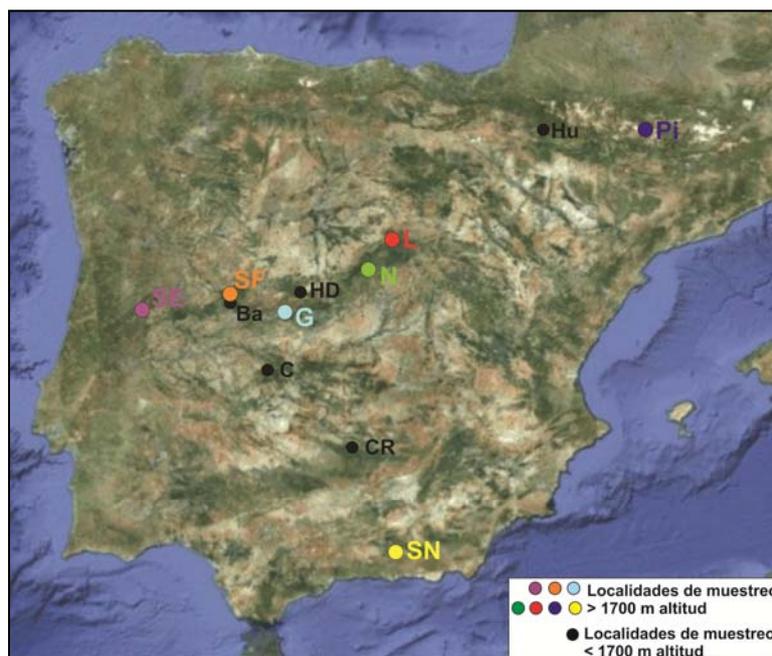


Figura 2.1.- Mapa de la Península Ibérica con las localidades de muestreo de especímenes del grupo de *R. geographicum*. No se señalan las localidades de muestreadas para la recolección de especímenes de otros grupos del subgénero *Rhizocarpon*.

Tabla 2.1.- Localidades y coordenadas de muestreo en la Península Ibérica. En negrita se indica la abreviatura para cada localidad y en gris las localidades muestreadas para otros grupos del subgen. *Rhizocarpon*.

Sistema Montañoso / P.N-Sierra	Localidad (Abreviatura) / Fecha Recolección	Coordenadas y Altitud	Nº Indv. Incluidos
Sist. Central / Sierra de Estrella (Portugal)	La Torre (SE)/ 26-03-2009	40° 19' 44" N 7° 36' 7.9" O Alt. 1930 m	11
Sist. Central / Sierra de Francia	Peña de Francia (SF)/ 05-06-2009	40° 30' 54.3" N 6° 10' 8.1" O Alt. 1723 m	13
Sist. Central / Sierra de Gredos	Los Barrerones, Plataforma de Gredos (G)/ 02-05-2008	40° 16' 12.93" N 5° 15' 39.20" O Alt. 2190 m	19
Sist. Central / Sierra de Guadarrama	Pico de La Najarra (N)/ 25-10-2007	40° 49' 15" N 3° 49' 48" O Alt. 2020 m	16
Sist. Central / Sierra de Somosierra- Ayllón	Pico Lobo (L)/ 1-11-2007	41° 11' 31.8" N 3° 27' 56.9" O Alt. 2190 m	12
Cordill. Bética / Sierra Nevada	Observatorio de Mohón del Trigo (SN)/ 13-06-2008	37° 05' 27.51" N 3° 23' 1.76" O Alt. 2576 m	15
Cordill. Pirenaica / P.N Aigüestortes y Estany de Sant Maurici	Subida al Montardo (Pi)/ 14-07-2009	42° 36' 29.4" N 0° 53' 14.7" O Alt. 2570 m	12
Inmediaciones Sist. Central / Sierra de Francia	Las Batuecas (Ba)/ 2008	40° 27' 35.92" N 6° 8' 39.56" O Alt. 550 m	1
Montes de Toledo / Sierra de las Villuercas	Río Ibor, Cáceres (C)/ 29-01-2009	39° 31' 24.6" N 5° 21' 23.3" O Alt. 661 m	1
Sierra Morena	Solana del Pino, Ciudad Real (CR)/ 25-08-2008	38° 28' 59" N 4° 6' 54" O Alt. 981 m	1
Sist. Central / Sierra de Gredos	Las Parameras-Hija de Dios (LP)/ 04-05-2008	40° 31' 37" N 4° 57' 53" O Alt. 1230 m	1
Pre-Pirineo / Sierra de Guara	Huesca (Hu)/ 10-10-2009	42° 29' 22" N 0° 16' 58" O Alt. 890 m	4
Is. Canarias/ Isla de El Hierro	Cruce de Guarazoca (CG)/ 15-06-2008	27° 47' 59" N 17° 57' 15" O Alt. 1103 m	2
P.N. Cabañeros	Las Becerras-Toledo (T)/ 16-09-2010	39° 33' 46" N 4° 39' 20" O Alt. 816 m	2
Sist. Central/ Sierra de Guadarrama	Cima de Peñalara (Pñ)/ 20-06-2009	40° 51' 02'' N 04° 57' 53'' O Alt. 2410 m	1

Tabla 2.2.- Localidad, Recolector y Código de Herbario de las distintas especies y subespecies del grupo de *R. geographicum* estudiados. Los especímenes con un * fueron incluidos en el análisis extra realizado para el subgénero *Rhizocarpon*.

Especies y Subespecies	Localidad / Recolector	Cód. Herbario
<i>R. drepanodes</i>	Ba/ Crespo A.	*MAF-16651
	C/ Roca-Valiente B.	*MAF-16652
	SF/ Roca-Valiente B.	MAF-16738
<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16668
	SE/ Roca-Valiente B.	*MAF-16722
	SF/ Roca-Valiente B.	*MAF-16730
	SF/ Roca-Valiente B.	MAF-16733
<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16662
	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16666
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	*MAF-16641
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	*MAF-16646
	Pi/ Roca-Valiente B.	MAF-16721
	SE/ Vivas M. & Lumbreras A.	MAF-16709
	SE/ Roca-Valiente B.	MAF-16732
	SN/ Roca-Valiente B. & Amo G.	MAF-16677
	SN/ Roca-Valiente B. & Amo G.	MAF-16683
<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>	Pi/ Roca-Valiente B.	*MAF-16718
	Pi/ Roca-Valiente B.	*MAF-16719
<i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i>	G/ Roca-Valiente B.	*MAF-16659
	G/ Roca-Valiente B.	*MAF-16663
	L/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16692
	L/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16693-2
<i>R. lecanorinum</i>	Pi/ Roca-Valiente B.	MAF-16726
	G/ Roca-Valiente B.	*MAF-16665
	G/ Roca-Valiente B.	*MAF-16670
	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16672
	Hu/ García-Catalá S. & Zamora J.C.	MAF-16715
	LP/ Roca-Valiente B.	MAF-16673
	SE/ Vivas M. & Lumbreras A.	MAF-16705
	SF/ Roca-Valiente B.	MAF-16731
	SN/ Roca-Valiente B. & Amo G.	MAF-16689
<i>R. macrosporum</i>	Hu/ García-Catalá S. & Zamora J.C.	MAF-16716
	L/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16699
	L/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16700
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	*MAF-16635
	Pi/ Roca-Valiente B.	MAF-16723
	SE/ Vivas M. & Lumbreras A.	MAF-16703
	SE/ Vivas M. & Lumbreras A.	MAF-16711
	SF/ Roca-Valiente B.	MAF-16737
	SF/ Roca-Valiente B.	MAF-16740
	SF/ Roca-Valiente B.	MAF-16741
	SN/ Roca-Valiente B. & Amo G.	*MAF-16678
<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16667
	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16671
	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16656
	L/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16690
	L/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16698
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	*MAF-16638
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	*MAF-16644
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16647
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16650
	Pi/ Roca-Valiente B.	MAF-16724
	Pi/ Roca-Valiente B.	MAF-16725
	SE/ Vivas M. & Lumbreras A.	MAF-16712
	SE/ Vivas M. & Lumbreras A.	MAF-16713
SN/ Roca-Valiente B. & Amo G.	MAF-16681	
<i>R. riparium</i> subsp. <i>riparium</i>	L/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16694
	L/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16696
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	*MAF-16636
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	*MAF-16640

Tabla 2.2.- (Continuación)		
Especies y Subespecies	Localidad / Recolector	Cód. Herbario
<i>R. saanaëense</i>	Hu/ García-Catalá S. & Zamora J.C.	*MAF-16714
<i>R. sphaerosporum</i>	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16664
	L/ Roca-Valiente B. & Pérez Ortega S.	MAF-16691
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	*MAF-16643
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	*MAF-16645
	Pi/ Roca-Valiente B.	MAF-16720
	Pi/ Roca-Valiente B.	MAF-16728
	SE/ Vivas M. & Lumbreras A.	MAF-16710
	SN/ Roca-Valiente B. & Amo G.	MAF-16684
<i>R. sublucidum</i>	G/ Roca-Valiente B.	*MAF-16655
	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16657
	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16660
	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16661
	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16669
	Hu/ García-Catalá S. & Zamora J.C.	MAF-16881
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	*MAF-16639
	SE/ Vivas M. & Lumbreras A.	MAF-16707
	SF/ Roca-Valiente B.	MAF-16734
	SN/ Roca-Valiente B. & Amo G.	MAF-16680
	SN/ Roca-Valiente B. & Amo G.	MAF-16688
<i>R. tavaresii</i>	CR/ Pérez-Ortega S.	*MAF-16653
	G/ Roca-Valiente B.	*MAF-16658
	Pi/ Roca-Valiente B.	MAF-16727
	SE/ Vivas M. & Lumbreras A.	MAF-16704
	SE/ Vivas M. & Lumbreras A.	MAF-16708
	SF/ Roca-Valiente B.	MAF-16735
	SN/ Roca-Valiente B. & Amo G.	MAF-16679
	SN/ Roca-Valiente B. & Amo G.	MAF-16686
<i>R. tinei</i>	G/ Roca-Valiente B.	MAF-16654
	L/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16693
	L/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16695
	L/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	MAF-16697
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	*MAF-16642
	N/ Roca-Valiente B. & Pérez-Ortega S.	*MAF-16649
	Pi/ Roca-Valiente B.	MAF-16717
	SE/ Vivas M. & Lumbreras A.	MAF-16706
	SF/ Roca-Valiente B.	MAF-16729
	SF/ Roca-Valiente B.	MAF-16739
	SN/ Roca-Valiente B. & Amo G.	MAF-16685
	SN/ Roca-Valiente B. & Amo G.	MAF-16687

Identificación de las especies: análisis anatómico y químico

Para el estudio anatómico de las diferentes especies se han tenido en cuenta los caracteres morfológicos y químicos analizados por los distintos autores especialistas en el grupo; Räsänen (1942a y b; 1943b; 1944; 1949b); Runemark (1956a y b); Thomson (1967); Feuerer (1978); Poelt (1988); Timdal (1988) y Clayden (2004).

Se han seguido como referencias principales para la identificación, la monografía de Runemark (1956a) y la clave resumen para el subgénero *Rhizocarpon* de Poelt (1988). En muchos casos, los especímenes identificados no se ajustan completamente a la descripción morfo-química de las especies dada en estos trabajos.

La decisión para atribuir un determinado binomen en tales casos se ha basado en el conjunto de los caracteres más que en uno sólo de ellos; no obstante los caracteres relacionados con los ascocarpos (química y anatomía del apotecio y caracterización de las ascósporas) se han considerado más importantes que otros como el grosor o forma de las areolas.

Bajo la lupa binocular, Nikon MSZ-1, se observaron los especímenes tomando nota de los distintos caracteres anatómicos macro-morfológicos necesarios para la identificación del material y para el estudio anatómico, observando un total de 8 caracteres macro-morfológicos, de los cuales el número de apotecios por cm² no se había tenido en cuenta hasta ahora (Tabla 2.4).

Caracteres químicos: Las reacciones químicas al I y al Pd se realizaron por *spot test* aplicando, bajo la lupa binocular con un capilar, una gota de producto en la médula de 3 areolas diferentes por cada uno de los talos de los distintos especímenes estudiados, (Tabla 2.3). La reacción a la KOH del epihimenio se realizó bajo el microscopio óptico sobre los cortes transversales (3 cortes por talo) del apotecio utilizados para la toma de datos anatómicos micro-morfológicos. Para la determinación del metabolismo secundario se realizó utilizando la Cromatografía en Capa Fina (TLC), método estandarizado, desarrollado por Culberson *et al.* (1970, 1972). Como sustancia patrón se ha usado una mezcla del extracto del metabolismo secundario del talo de diferentes líquenes que contienen en altas concentraciones las sustancias que se pueden hallar en las distintas especies de *R. geographicum* s. lat. Dichas especies fueron obtenidas del herbario MAF de la Facultad de Farmacia y del herbario MACB de la Facultad de Biología de la UCM (Tabla 2.3). La identificación de los metabolitos secundarios se realizó según Elix (1996) midiendo la distancia a la mancha y el frente del solvente, usando para ello el trabajo de Orange *et al.* (2001) y el programa de ordenador Wintabolites de Mietzsch *et al.* (1994), observando el color y determinando el Rf de cada mancha.

Tabla 2.3.- Especies utilizadas como patrón para TLC.

Especie	Sustancia a Identificar	Cód. Herbario
<i>Cladonia miniata</i> var. <i>parvipes</i> (Vain.) Zahbr.	Ac. Barbático	MACB-92965
<i>Lecanora muralis</i> (Schreb.) Rabenh.	Ac. Psorómico	MAF-14325
<i>Ochrolechia androgyna</i> (Hoffm.) Arnold	Ac. Girofórico	MAF-6697
<i>Xanthoparmelia conspersa</i> (EhR. ex Ach.) Hale	Ac. Estíctico	MAF-13936
<i>Rhizocarpon geographicum</i> (L.) DC.	Ac. Rhizocárpico	MAF-14324

Para el estudio de los caracteres anatómicos micro-morfológicos se realizaron cortes transversales a mano alzada de los apotecios y las areolas, usando cuchilla y pinzas bajo la lupa binocular a 40x. En cada talo se cortaron 3 apotecios y 3 areolas diferentes tomando 3 medidas de cada uno de ellos, para las ascósporas se midieron aprox. 10 esporas desarrolladas por talo a 1000x aumentos. Los cortes realizados fueron montados en portas con agua y llevados bajo el microscopio óptico, Nikon Eclipse 80i (Tabla 2.4). Se estudiaron un total de 10 caracteres anatómicos micro-morfológicos, 3 de ellos no estudiados anteriormente; altura del apotecio, anchura del excípulo y color del excípulo. De todas las medidas tomadas se realizaron las medias aritméticas que se usaron para los distintos análisis estadísticos.

En total se han estudiado 28 caracteres anatómico-químicos.

Tabla 2.4- Caracteres macro, micro-morfológicos y reacción química por test de mancha. Abreviaturas por carácter, descripción y magnitud-precisión de las medidas tomadas.			
Caract. Macromorf.	Abreviatura	Caract. Micromorf.	Abreviatura
Color del Talo	CT 0= Amarillo pálido 1=Amarillo normal 2= Amarillo-Verdoso fuerte	Altura de la Areola	AAR Precisión de 100 µm
Protalo visible y bien desarrollado	Hip 0= Protalo no visible 1= Protalo visible	Diámetro del Apotecio	DAP Precisión de 100 µm
Forma de la Areola	FAR 0= Plana 1= Convexa	Altura del Apotecio	AAP Precisión de 100 µm
Areolas en forma de Collar	Coll 0= Ninguna 1= Algunas 2= Todas	Altura del Himenio	AHim Precisión de 100 µm
Diámetro de la Areola	DAR En mm. (15 medidas por talo)	Color del Himenio	CHim 0=Hialino 1= Verdoso
Número de Apotecios	NAP Nº Apotecio x cm ² (3 cm ² por talo)	Anchura del Excípulo	ANEx Precisión de 10 o 100 µm
Forma del Apotecio; cóncavo, convexo o plano.	FAP 0= Plano 1= Cóncavo 2= Convexo	Color del Excípulo	CEx 0= Marrón-rojizo 1= Blanco-verdoso
Apotecios circulares o angulares en su mayoría	A/C 0= Angular 1= Circular	Células por Espora	CSP Precisión de 10 µm
Reacción al Lugol por test de mancha	I 0= negativa 1= Positiva	Longitud de las Esporas	LgSp Precisión de 10 µm
Reacción a la Parafenildiamina por test de mancha	Pd 0= Negativa 1= Positiva de color amarillo 1*= Positiva de color naranja 2= Positiva de color naranja-rojizo	Anchura de las Esporas	AnSp Precisión de 10 µm
		Reacción del Epihimenio a la potasa	KOH 0=negativa 1= Positiva

Secuenciación de ADN y análisis filogenético

Se ha secuenciado el ADN del micobionte para los 100 especímenes del grupo de *R. geographicum* de los que se estudió su anatomía previamente (Tabla 2.2 y Tabla 2.4). Las condiciones de extracción, amplificación y secuenciación así como la revisión de las secuencias obtenidas y los alineamientos fueron realizados según se detallan en la Metodología General.

Se incluyeron 9 especímenes más pertenecientes a los grupos *Alpicola*, *Superficiale* y *Viridiatrum* con el fin de encontrar las posibles relaciones filogenéticas con el grupo de *R. geographicum* (Tabla 2.5). En todos los casos se utilizaron los *primers* correspondientes a la región ITS nu y LSU mt. Se recomienda ver la Tabla 5 de la Metodología general para los grupos externos utilizados en los análisis filogenéticos.

Tabla 2.5- Especies y Subespecies de otros grupos del subgénero *Rhizocarpon* incluidas.

Especies [Localidad]	Cód. Herbario
Grupo <i>Superficiale</i> :	
<i>Rhizocarpon superficiale</i> (Schaer.) Vain. subsp. <i>superficiale</i>	MAF-16736[SF] MAF-16682 [SN] MAF-16676[SN]
<i>Rhizocarpon pussillum</i> Runem. [Pñ]	MAF 16674
<i>Rhizocarpon effiguratum</i> (Anzi) Th. Fr. [SN]	MAF 16674
Grupo <i>Alpicola</i> :	
<i>Rhizocarpon alpicola</i> (Hepp.) Rabh. [N]	MAF-16648 MAF-16637
Grupo <i>Viridiatrum</i> :	
<i>Rhizocarpon viridiatrum</i> (Wulf.) Koerb. [CG]	MAF-17048
<i>Rhizocarpon subtile</i> Runem. [CG]	MAF-17049

El análisis bayesiano (MC)³ se realizó asumiendo el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica GTR+ I+ G (*General Time Reversible*) (Rodríguez *et al.* 1990), teniendo en cuenta la distribución de cambios entre las bases nitrogenadas. En la aproximación realizada por jModelTest se concluyó que el modelo de sustitución nucleotídica más adecuado era el TIM2+ G. Al tratarse de un modelo evolutivo no contemplado por el análisis bayesiano, se eligió el modelo con menor *likelihood* (*Ln likelihood*) y que fuera implementado por dicho análisis. Se realizó teniendo en cuenta la partición de cada región como independiente una de otra, se corrió un total de 4 *runs* paralelos, 8 millones de generaciones y 8 cadenas. Cada 1000 árboles muestreados, un árbol fue salvado en un archivo generado por el programa, eliminando los 3.000 primeros árboles como *burn-in*.

El análisis de MP se llevó a cabo siguiendo las especificaciones detalladas en la sección correspondiente de la Metodología General.

Todos los análisis estadísticos de filogenia se llevaron a cabo corriendo dos análisis paralelos cuyos parámetros fueron idénticos; en uno de ellos se incluyó las secuencias pertenecientes a individuos del grupo *Viridiatrum* y en el otro se excluyeron dichas secuencias, indicándose según corresponda.

Se realizó un análisis extra complementario a los otros dos utilizando únicamente el primer de la región ITS nu y añadiendo secuencias del género *Phaeothallus*, que nos ayudará a entender mejor las relaciones filogenéticas dentro del género *Rhizocarpon*. Para dicho análisis se utilizaron los especímenes del grupo de *R. geographicum* de la Tabla 2.2 marcados con un *, las secuencias de los especímenes que se detalla en la Tabla 2.5, más las secuencias de los especímenes señalados en la Tabla 2.6., i.e. un total de 45 taxones.

El análisis bayesiano (MC)³ se realizó asumiendo el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica GTR+ I+ G (*General Time Reversible*) (Rodríguez *et al.* 1990), teniendo en cuenta la distribución de cambios entre las bases nitrogenadas. Se corrió un total de 2 runs paralelos, 4 millones de generaciones y 8 cadenas. Cada 100 árboles muestreados, un árbol fue salvado en un archivo generado por el programa, eliminando los 1.000 primeros árboles como *burn-in*. El análisis de MP se llevó a cabo siguiendo las especificaciones detalladas en la sección correspondiente de la Metodología General.

Tabla 2.6- Especies de otros grupos del subgénero *Rhizocarpon* y del subgénero *Phaeothallus* incluidas en el análisis extra para el género *Rhizocarpon*. Se incluye número de acceso de las secuencias bajadas del GenBank.

Especies [Localidad]	Cód. Herbario	Nº Acceso GenBank
Grupo <i>Viridiatrum</i>		
<i>Rhizocarpon tetrasporum</i> Runem. [T]	MAF-16701	---
<i>Rhizocarpon lusitanicum</i> (Nyl.) Arnold [T]	MAF 16702	---
Subgénero <i>Phaeothallus</i>		
<i>Rhizocarpon copelandii</i> (Körb.) Th. Fr.	---	AF483617
<i>Rhizocarpon geminatum</i> Körb.	---	AF483614
<i>Rhizocarpon lavatum</i> (Fr.) Hazsl.	---	AF483610
<i>Rhizocarpon norvegicum</i> Räs.	---	AF483618
<i>Rhizocarpon petraeum</i> (Wulfen) A. Massal.	---	AF483609

Análisis estadístico de los caracteres morfológicos

Para el análisis estadístico de los caracteres morfológicos se han realizado 3 aproximaciones: Estadística descriptiva de las variables, *t-Student* y Correlación de *Pearson*, clasificación por *Clusters* y análisis Discriminante, realizados en su mayoría con la ayuda del Servicio Informático de Apoyo a la Docencia y a la Investigación de la UCM.

-Estadística descriptiva de las variables, *t-Student* y Correlación de *Pearson*. Las variables categóricas: CT, Hip, FAr, Coll, FAp, A/C, CHim y CEx, y los compuestos químicos identificados por *spot test* y por TLC se compararon con la topología del árbol filogenético. Se calculó además el porcentaje de aparición y en qué estado lo hacían estos caracteres, teniéndose en cuenta los porcentajes de aparición por encima del 70%. Para las variables cuantitativas AAr, DAr, NAp, DAp, AAp, AHim, AnEx, CSp, LgSp y AnSp), se realizaron análisis estadísticos descriptivos de las variables estableciendo los máximos, mínimos, media y desviación estándar (SD) de las medias de las medidas tomadas usando el programa SAS v. 9.1., e ilustrándose con el programa Statgraphics Plus v. 4.1, con el que se calculó el p-valor (significativo con valores ≤ 0.05) correspondiente al análisis de la *t-Student*. También se calcularon los coeficientes de Correlación de *Pearson* con el programa SAS v. 9.1. Se recomienda revisar la Tabla 2.4 para la correspondencia de las abreviaturas y las medidas tomadas.

-Clasificación por *Clusters*: se realizó utilizando el programa SPAD v. 5.6. Se incluyeron todos los caracteres macro y micro-morfológicos (cuantitativos y cualitativos). En cada análisis de *cluster* resultante aparecerá una o varias variables activas dentro de cada clase obtenida que la explica. De todos los *cluster* obtenidos se eligió el que tuviera un p-valor más significativo con relación al análisis de la χ^2 . Se cruzaron los datos obtenidos por la agrupación con *cluster* con la agrupación obtenida del análisis de los caracteres moleculares.

-Análisis Discriminante: se realizó utilizando el programa SAS v. 9.1. y los datos se dividieron en 2 grupos según los resultados del análisis filogenético. El análisis seleccionó las variables numéricas -cuantitativas- (caracteres anatómicos macro y micro-morfológicos, en total 10 caracteres) que más se relacionaban con la variable grupo. Por otro lado, calculó la probabilidad posterior de que cada individuo perteneciera al grupo asignado a partir de valores de $pp \geq 0,50$. Así el análisis establece si existen diferencias significativas entre los grupos dados y que variable o variables explicarían dichas diferencias si existieran.

RESULTADOS

Análisis filogenético

Se ha generado un total de 218 secuencias nuevas, (109 secuencias del total de la región de ITS nu y 109 secuencias parciales del marcador LSU mt) de las distintas especies y subespecies del grupo estudiadas y de las diferentes especies y subespecies de los otros tres grupos del subgénero *Rhizocarpon* incluidos -Tablas 2.2 y 2.5-. Se obtuvo un alineamiento final de una longitud total de 498 pb para el ITS nu y 388 pb para el LSU mt.

El árbol consenso 50% *Majority Rule* obtenido a partir de 29000 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ -Fig. 2.2- se generó a partir de dos matrices independientes: Una matriz de 498 caracteres de los cuales 308 son informativos para la región del ITS nu, y una matriz de 388 caracteres de los cuales 135 son informativos para la región LSU mt. Se obtuvo una matriz general de 886 caracteres de los cuales 443 eran informativos. Para los valores de los parámetros de probabilidad se recomienda revisar el Apéndice 2 apartado B. 1. El análisis de MP considero 510 caracteres constantes, 289 como caracteres parsimónicamente informativos y 87 caracteres variables fueron parsimónicamente no informativos.

En el árbol filogenético obtenido observamos como dentro del subgénero *Rhizocarpon* encontramos el grupo *Alpicola*, el grupo *Viridiatrum* y el grupo de *R. geographicum* formando clados monofiléticos con elevada pp y *bootstrap*. El grupo *Superficiale* se encuentran formando dos clados diferentes, ambos monofiléticos y respaldados por ambos análisis filogenéticos. Todos los individuos del grupo de *R. geographicum* forman un clado monofilético bien respaldado con una elevada probabilidad posterior (pp=1.00) y un alto *bootstrap* (= 71%).

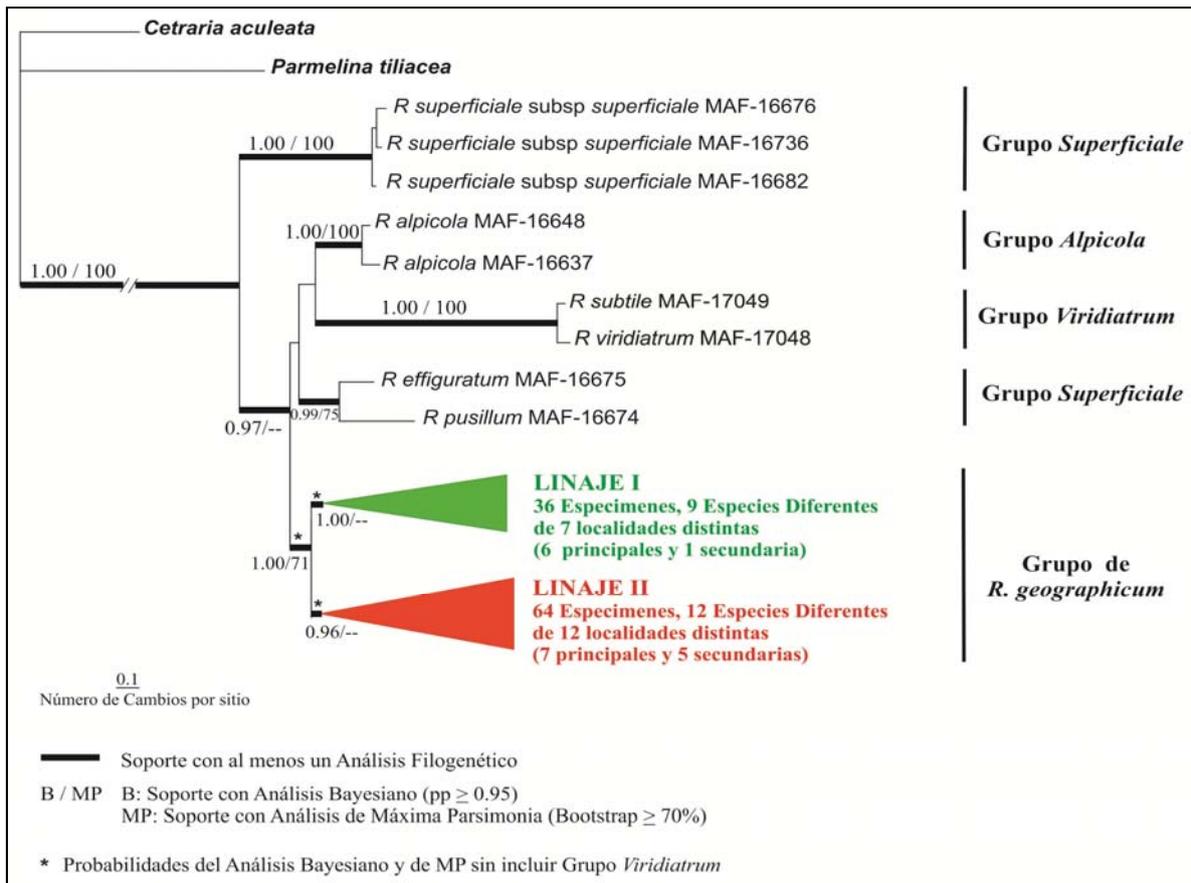


Figura 2.2.- Árbol Filogenético del grupo de *R. geographicum* en la Península Ibérica. Árbol 50% *Majority Rule* a partir de 29000 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ de la regiones ITS nu y LSU mt. Linaje I en verde y Linaje II en rojo a partir del concepto general de especie (De Queiroz 2007).

Dentro del gran clado monofilético que forma el grupo de *R. geographicum* se diferencian dos linajes evolutivos:

El **LINAJE I** que comprende 36 individuos pertenecientes a 6 localidades principales (N, G, SF, SE, Pi, SN) y a una localidad secundaria (Hu), que se han identificado como 9 especies y subespecies incluidas en el grupo:

- R. geographicum* subsp. *diabasicum*
- R. geographicum* subsp. *frigidum*
- R. geographicum* subsp. *geographicum*
- R. geographicum* subsp. *prospectans*
- R. lecanorinum*
- R. macrosporum*
- R. riparium* subsp. *lindsayanum*
- R. sublucidum*
- R. tinei*

El **LINAJE II** que en el árbol filogenético comprende 64 individuos pertenecientes a las 7 localidades principales (N, L, G, SF, SE, Pi, SN) y a las 5 localidades secundarias (Ba, C, CR, Hu y LP) que se han identificado como 12 especies y subespecies incluidas en el grupo siendo este linaje el más diverso de los dos:

- R. drepanodes*
- R. geographicum* subsp. *frigidum*
- R. geographicum* subsp. *prospectans*
- R. lecanorinum*
- R. macrosporum*
- R. riparium* subsp. *lindsayanum*
- R. riparium* subsp. *riparium*
- R. saanaëense*
- R. sphaerosporum*
- R. sublucidum*
- R. tavaresii*
- R. tinei*

Se debe hacer notar que las probabilidades indicadas en el árbol filogenético de la Fig. 2.2 para el grupo de *R. geographicum* son las obtenidas del análisis filogenético realizado sin incluir a las especies del grupo *Viridiatrum*. Al incluir las especies de dicho grupo, la topología del árbol así como las relaciones filogenéticas no variaban, sin embargo los valores de *bootstrap* del análisis de MP para el grupo de *R. geographicum* y las probabilidades posteriores del análisis Bayesiano para el Linaje II, bajaron sutilmente por debajo del umbral de significancia, por lo que a nivel del grupo de *R. geographicum* se excluyó de los análisis al grupo *Viridiatrum*.

Dado los resultados obtenidos en el árbol consenso de la Fig. 2.2, se generó un árbol consenso extra 50% *Majority Rule* obtenido a partir de 79000 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ -Fig. 2.3-. Este árbol se elaboró a partir de 1 matriz de 493 caracteres de los cuales 277 son informativos para la región del ITS nu. (Para los valores de los parámetros de probabilidad se recomienda revisar el Apéndice 2 apartado B. 1.). El análisis de MP considero 236 caracteres constantes, 202 como caracteres parsimónicamente informativos y 55 caracteres variables fueron parsimónicamente no informativos.

Para los valores de los parámetros de probabilidad se recomienda revisar el Apéndice 2 apartado B. 2.

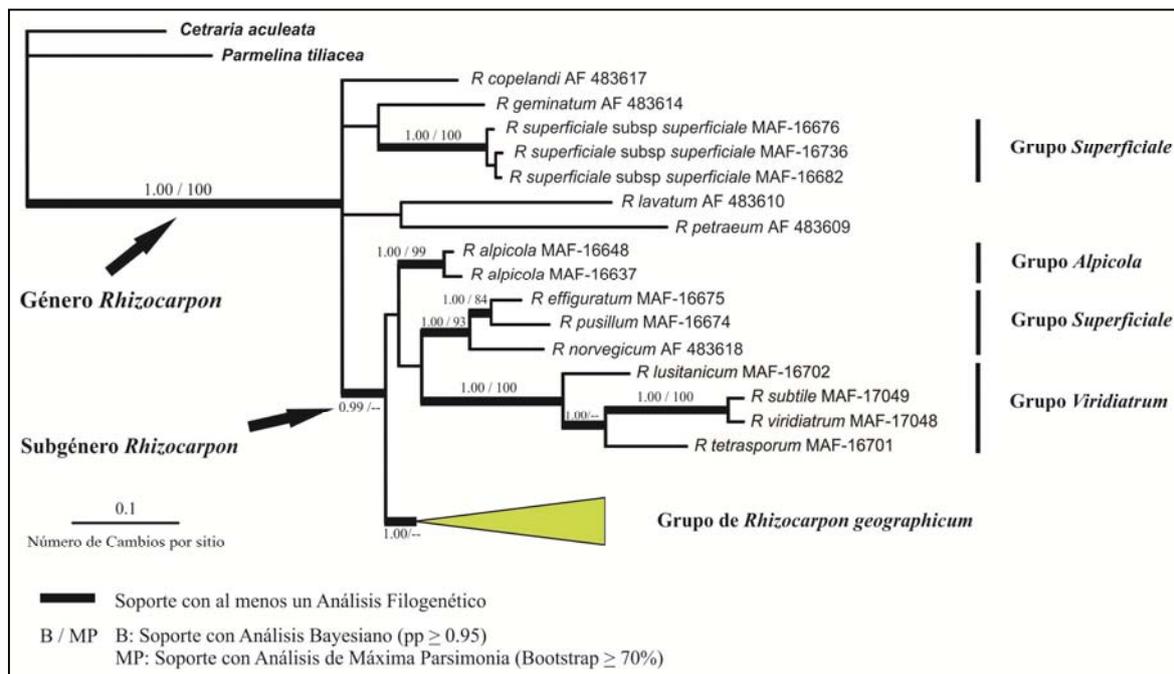


Figura 2.3.- Árbol Filogenético del género y subgénero *Rhizocarpon*. Árbol 50% Majority Rule a partir de 79000 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ de la regiones ITS nu y LSU mt.

En el árbol filogenético de la Fig. 2.3 el género *Rhizocarpon* aparece formando un clado respaldado por una elevada pp y *bootstrap*. El subgénero *Rhizocarpon*, del que se han incluido individuos pertenecientes a todos los grupos del subgénero, muestra un posible comportamiento polifilético en los resultados obtenidos ya que individuos incluidos tradicionalmente en el subgénero aparecen formando un clado monofilético fuera de este. Además, el grupo *Superficiale* resulta también polifilético ya que los individuos del grupo se encuentran formando dos clados diferentes monofiléticos y bien respaldados por elevadas pp y *bootstrap*, uno de ellos parece encontrarse fuera del subgénero *Rhizocarpon* junto con especímenes incluidos en el subgénero *Phaeothallus*.

Análisis contrastado de los caracteres anatómicos macro-morfológicos y químicos con la topología de los árboles filogenéticos

En total se han obtenido 2800 medidas, que son las medias aritméticas de 5900 medidas de los 12 caracteres anatómicos cuantitativos y de las observaciones de 18 caracteres anatómicos-químicos cuantitativos estudiados para los 100 individuos del grupo de *R. geographicum* incluidos en el estudio.

En las Tablas A. 1 (a y b) y Tablas A. 2 (a y b) del Apéndice 2 se muestran dichas medidas para los diferentes caracteres anatómicos macro, micro-morfológicos y químicos observados, el orden de aparición de los individuos estudiados es según el orden en el que aparecen en el árbol filogenético (Fig. 2.4 y 2.5). Las medidas tomadas para los caracteres anatómicos y químicos cualitativos, 18 en total, fueron contrastadas con el resultado obtenido por el análisis filogenético para cada linaje. De estos 18 caracteres 6 son macro-morfológicos, 2 son caracteres micro-morfológicos y 10 son químicos.

El árbol consenso 50% *Majority Rule* obtenido a partir de 29000 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³, -Fig. 2.4.a y b, 2.5.a y b y 2.6.a y b del grupo de *R. geographicum*-, se generó a partir de dos matrices independientes: una matriz de 498 caracteres de los cuales 299 son informativos para la región del ITS nu, y una matriz de 388 caracteres de los cuales 132 son informativos para la región LSU mt. Se obtuvo una matriz general de 886 caracteres de los cuales 431 eran informativos. Para los valores de los parámetros de probabilidad se recomienda revisar el Apéndice 2 apartado B. 2. El análisis de MP consideró 524 caracteres constantes, 274 como caracteres parsimónicamente informativos y 88 caracteres variables fueron parsimónicamente no informativos.

Los individuos aparecen en los árboles filogenéticos con el nombre dado tras su determinación, su número de inclusión en el herbario MAF y se les ha otorgado un código de color que indica la localidad geográfica donde fueron recolectados -Fig. 2.1, Fig. 2.4.a y b, Fig. 2.5.a y b-.

En las Figuras 2.4.a y b se ha contrastado la aparición de los caracteres anatómicos macro-morfológicos más importantes según los especialistas en el grupo y en qué estado lo hacen con la topología del árbol filogenético: hipotalo ausente, areola con forma convexa, areola en forma de collar (algunas o todas), forma cóncava o convexa de los apotecios y apotecios circulares.

No se compararon ni el color del talo, ni el del himenio, ni el del excípulo por considerarlos con bajo valor diagnóstico tras el estudio de los individuos y la revisión bibliográfica más relevante (Runemark 1956a; Thomson 1967; Poelt 1988).

Tanto en el Linaje I como en el Linaje II se observan 5 clados con elevadas probabilidades posteriores y *bootstrap*, i.e. soportados por ambos análisis filogenéticos, no observándose patrones entre dichos clados y los caracteres. En el Linaje I encontramos 4 más pequeños, de entre 2 y 4 individuos, y un quinto clado más grande con 22 individuos. En el Linaje II estos 5 clados incluyen entre 4 individuos el más pequeño a 29 el más grande. Sin embargo, se ha tratado de encontrar algún carácter morfológico o químico en clados monofiléticos más pequeños que pudiera considerarse diagnóstico para dichos clados -ver Discusión-.

En la Figura 2.4.a -Linaje I- el análisis por *spot test* indica que todos los individuos estudiados son I +, Pd +, a excepción de 1 individuo que daría reacción -, y KOH + en la parte superior del epihimeno, excepto para 4 individuos que serían KOH -. En el Linaje II todos los individuos que lo componen son I +, la reacción Pd + se encuentra en 55 de los 64 individuos, y son KOH - 45 individuos.

En el caso del análisis del metabolismo secundario por TLC, se observa que el 100% de los individuos del grupo de *R. geographicum* poseen ácido rhizocárpico. El ácido psorómico aparece como el segundo ácido más común en ambos linajes: en el Linaje I no está presente sólo en 2 individuos, en el Linaje II no se encuentra en 18 individuos de los 64 que forman el linaje. Además en el Linaje I encontramos 1 individuo con ácido girofórico, *R. geographicum* subsp. *frigidum* MAF-16677, y 1 individuo con ácido estético, *R. lecanorinum* MAF-16731.

El Linaje II es mucho más variado con respecto al metabolismo secundario, 6 individuos de 4 especies del grupo distintas presentan los ácidos correspondientes al llamado complejo del ácido estético, de estos 6 individuos sólo 3 de ellos se encuentran formando un clado monofilético. El ácido estético aparece en 11 individuos de 4 especies diferentes, de estos 11 individuos 6 forman 2 clados monofiléticos respaldados con 3 individuos cada uno. El ácido girofórico está presente en 9 individuos de 6 especies distintas, pero únicamente 2 de ellos se agrupan en un clado monofilético, el resto se encuentran dispersos en las ramas del árbol filogenético del Linaje II. El ácido norestético aparece sólo en un individuo, *R. tinei* MAF-16693, y el ácido hipoestético en 2 individuos (*R. lecanorinum* MAF-16670 y *R. macrosporum* MAF-16741).

Tanto en la Figura 2.4.a y b -Linaje I y Linaje II caracteres anatómicos macro-morfológicos- como en la 2.5.a y b -Linaje I y Linaje II caracteres químicos-, podemos ver como las localidades de recolección se distribuyen a lo largo de ambos linajes, sin formar clados respaldados por localidad, ni agrupaciones por altitudes, ni por cercanía geográfica según las diferentes especies morfo-químicas, i.e. no hay alelos fijados en las localidades que se hayan podido identificar filogenéticamente.

Con respecto a la diversidad de especies y subespecies del grupo con respecto a la geografía y el número de individuos estudiados, la localidad más diversa sería la de Pirineos con 10 especies y subespecies en un muestreo de 12 individuos, y la Sierra de Estrella con 9 especies y subespecies diferentes en un muestreo de 11 individuos.

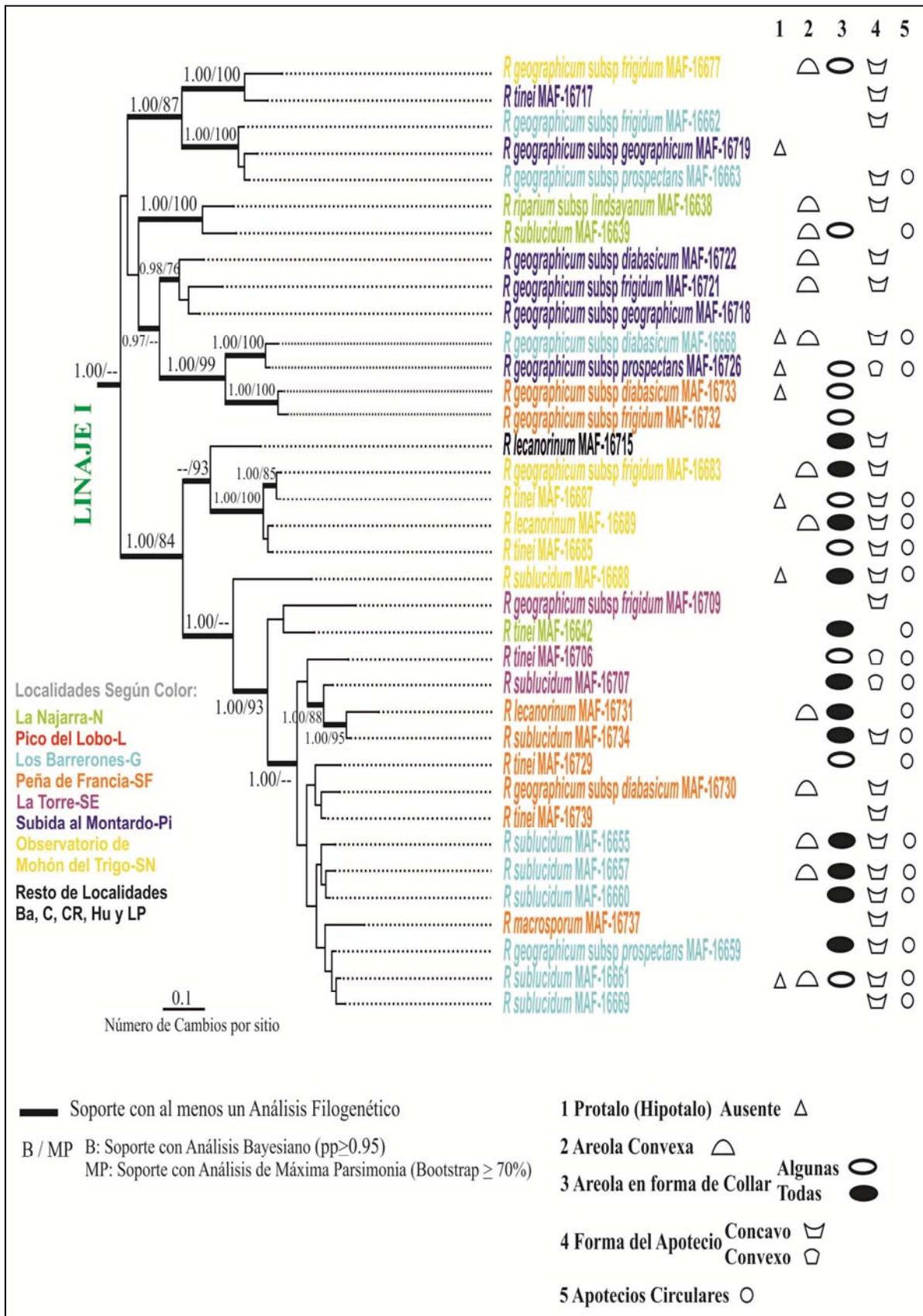


Figura 2.4.a.- Árbol Filogenético del Linaje I del grupo de *R. geographicum* en la Península Ibérica. Comparativa de los caracteres anatómicos macro-morfológicos con la distribución geográfica para cada individuo. Árbol 50% *Majority Rule* a partir de 29000 árboles muestreados con análisis bayesiano (MC)³ de la regiones ITS nu y LSU mt.

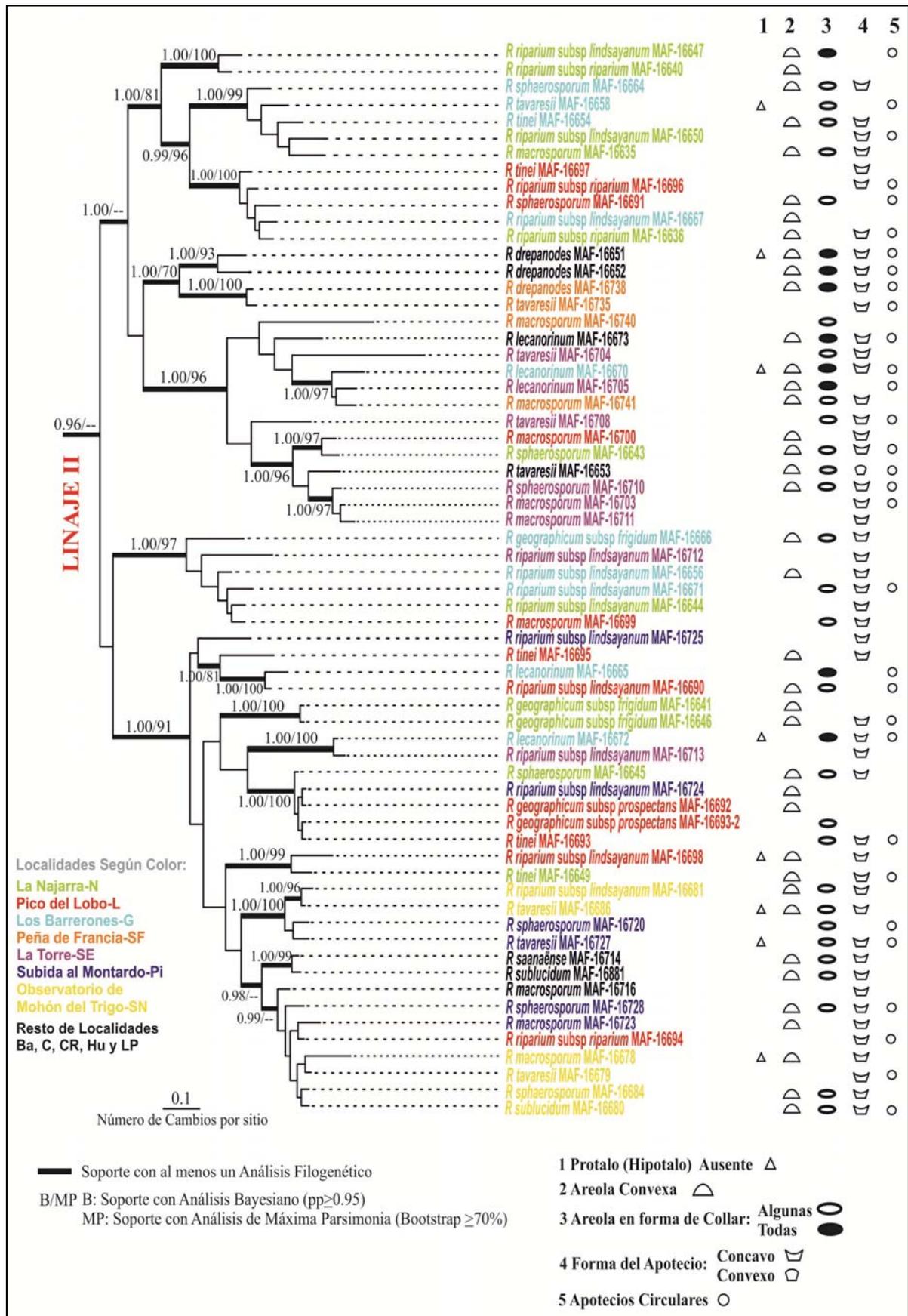


Figura 2.4.b.- Árbol Filogenético del Linaje II del grupo de *R. geographicum* en la Península Ibérica. Comparativa de los caracteres anatómicos macro-morfológicos con la distribución geográfica para cada individuo. Árbol 50% *Majority Rule* a partir de 29000 árboles muestreados con análisis bayesiano (MC)³ de la regiones ITS nu y LSU mt.

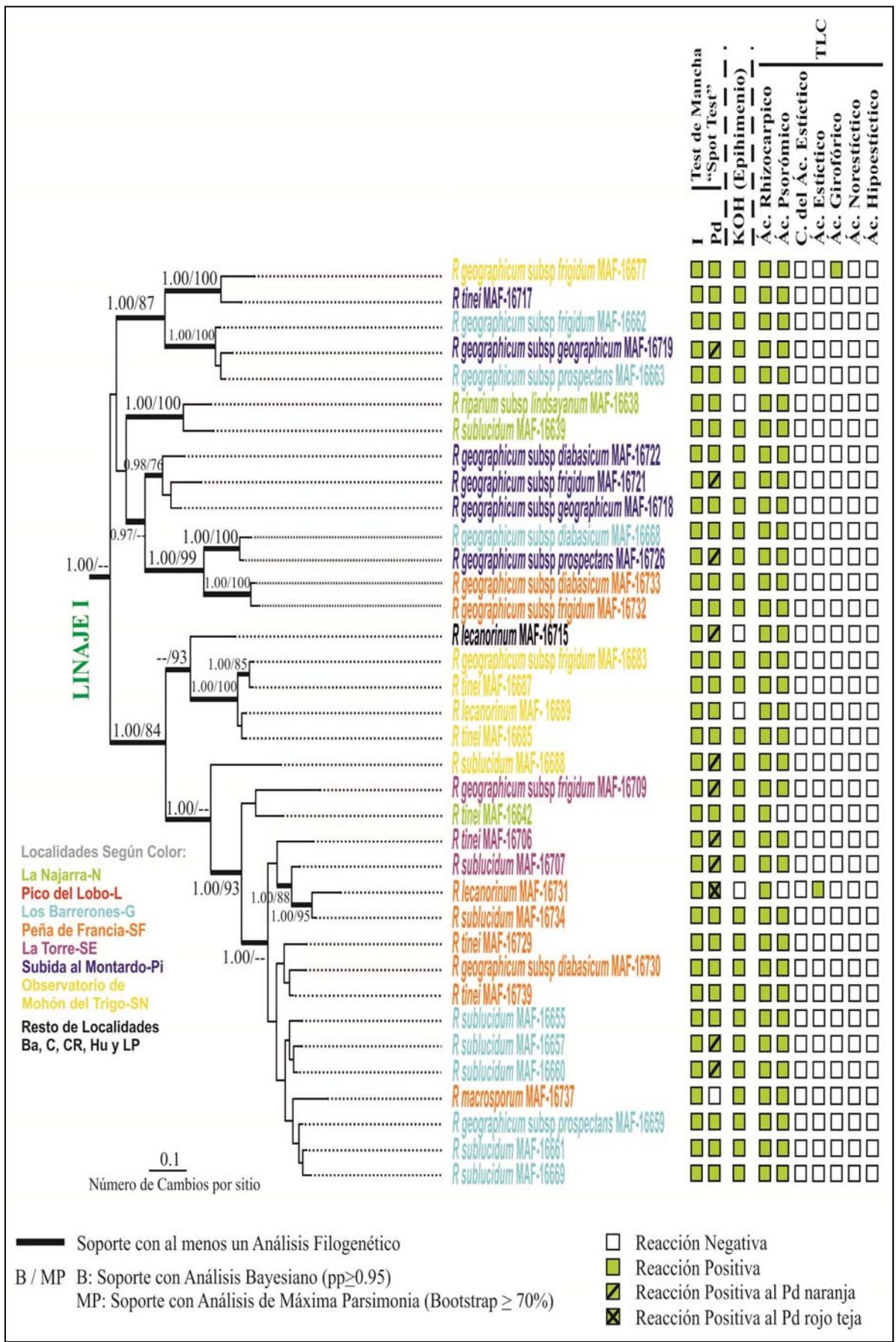


Figura 2.5.a.- Árbol Filogenético del Linaje I del grupo de *R. geographicum* en la Península Ibérica. Comparativa de los caracteres químicos con la distribución geográfica para cada individuo. Árbol 50% *Majority Rule* a partir de 29000 árboles muestreados con análisis bayesiano (MC)³ de la regiones ITS nu y LSU mt.

Análisis estadístico de los caracteres morfológicos

-Estadística descriptiva de las variables: En síntesis el carácter que mejor definiría el Linaje I (Tabla 2.7) sería la reacción KOH + del epihimenio apareciendo en un 88,9% de los individuos estudiados, mientras que para el Linaje II no habría ningún carácter que lo definiera estrictamente, ya que tanto la presencia de apotecios cóncavos, como la reacción Pd + en la medula y la presencia de ácido psorómico es muy elevada en ambos linajes, por lo que estos caracteres conducirían a error fácilmente.

Tabla 2.7.- Porcentajes de aparición de los caracteres anatómicos cualitativos y químicos por Linaje. Se indica en negrita los carácter medidos y los porcentajes de aparición superiores al 70%.

CARÁCTER	LINAJE I	LINAJE II
Color del Talo		
Amarillo Débil	8,3%	20,3%
Amarillo	55,5%	40,6%
Amarillo Fuerte-Verdoso	36,1%	39%
Hipotalo Ausente	19,4%	14%
Forma Convexa de la Areola	36,1%	60,9%
Areolas en Forma de Collar	63,9%	54,7%
Algunas	27,8%	39%
Todas	36,1%	15,6%
Forma del Apotecio		
Apotecio Plano	22,2%	20,3%
Apotecio Cóncavo	69,4%	78,1%
Apotecio Convexo	8,3%	1,5%
Apotecios Circulares	55,5%	51,5%
Color del Himenio	0%	18,7%
Color del Excípulo	25%	12,5%
Reacción I + Médula	100%	100%
Reacción Pd + Médula	97,2%	85,9%
Pd + Amarillo	66,7%	64%
Pd+ Naranja	27,8%	10,9%
Pd+ Rojo teja	2,8%	10,9%
Reacción KOH + del Epihimenio	88,9 %	29,7%
Ac. Rhizocárpico	100%	100%
Ac. Psorómico	98%	71,9%
Complejo del Ac. Estético	0%	9,4%
Ac. Estético	2,7%	17,2%
Ac. Girofórico	2,7%	14%
Ac. Norestético	0%	1,5%
Ac. Hipoestético	0%	3,1%

-Correlación de Pearson y t-Student: Con respecto a los valores obtenidos del análisis de Correlación de *Pearson*, mayores o al menos iguales a 0.7 (70%) y un p-valor ≤ 0.01 para considerarlos altamente correlacionados, entre las 10 variables cuantitativas que se han incluido en este análisis -Tabla 2.8-, los únicos caracteres directamente correlacionados serían la altura del himenio con la altura del apotecio y el número de células por espora con la longitud de estas (Fig. 2.6.a-b y Fig. 2.7.a-b).

	AAr	DAr	NAp	DAP	AAp	AHim	AnEx	CSp	LgSp	AnSp
AAr	1	0,41	-0,36	0,39	0,51	0,37	0,16	-0,22	-0,21	0,1
		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,1	0,02	0,83	0,28
DAr	0,41	1	-0,33	0,44	0,4	0,46	0,11	0,19	0,26	0,58
	<0,01		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,25	0,04	<0,01	<0,01
NAp	-0,36	-0,33	1	-0,15	-0,25	-0,27	0,18	0,25	0,1	0,02
	<0,01	<0,01		0,11	<0,01	<0,01	0,07	0,01	0,3	0,83
DAP	0,39	0,44	-0,15	1	0,57	0,43	0,23	0,11	0,12	0,11
	<0,01	<0,01	0,11		<0,01	<0,01	0,02	0,26	0,23	0,27
AAp	0,51	0,4	-0,26	0,57	1	0,77	0,25	0,06	0,23	0,19
	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		<0,01	0,01	0,5	0,02	0,05
AHim	0,37	0,47	-0,27	0,43	0,77	1	0,26	0,21	0,33	0,35
	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		<0,01		<0,01	<0,01
AnEx	0,16	0,11	0,18	0,23	0,25	0,26	1	0,21	0,21	0,35
	0,1	0,25	0,07	0,02	0,01	<0,01		0,03	0,03	<0,01
CSp	-0,22	0,19	0,25	0,11	0,06	0,21	0,21	1	0,74	0,59
	0,02	0,04	0,01	0,26	0,5	0,03	0,03		<0,01	<0,01
LgSp	-0,02	0,26	0,1	0,12	0,23	0,33	0,21	0,74	1	0,59
	0,83	0,01	0,3	0,23	0,02	0,01	0,03	<0,01		0,01
AnSp	0,1	0,29	0,02	0,11	0,19	0,35	0,35	0,59	0,59	1
	0,29	<0,01	0,83	0,27	0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	

Tabla 2.8.- Coeficientes de Correlación de Pearson y valores de probabilidad (p-valor) para los caracteres anatómicos cuantitativos. En negrita se indican los valores con correlaciones y p-valor significativos (C. Pearson $\geq \pm 0.7$, p-valor ≤ 0.01).

Comparando los valores de las medias mediante el análisis de la *t-Student* (p-valor significativo ≤ 0.05) -Tabla 2.9 y 2.8- y teniendo en cuenta los valores de la SD, mediana, los mínimos y los máximos, se observó como la mayoría de los caracteres medidos tienen valores que se solapan en ambos linajes. Mientras que la mayoría de los caracteres medidos no muestran diferencias significativas entre los individuos de cada linaje, el diámetro de la areola (DAP), el número de células por espora (CSp), la longitud de las esporas (LgSp) y la anchura de las esporas (AnSp) con p-valor significativo, se podrían utilizar como caracteres diagnósticos para cada linaje.

		Media	SD	Mínimo	Máximo	p-valor	t-student
AAr	Linaje I	504,7	155,6	265,2	802,8	0,95	-0,06
	Linajell	506,4	138,7	241,6	863,7		
DAr	Linaje I	0,8	0,3	0,5	1,5	0,27	1,10
	Linajell	0,8	0,3	0,4	1,8		
NAp	Linaje I	34,9	18,2	9,3	91,3	0,41	-0,82
	Linajell	38,5	23,0	7,3	114,0		
DAp	Linaje I	803,8	183,6	382,6	1302,0	0,02	2,36
	Linajell	717,3	171,7	310,7	1122,0		
AAp	Linaje I	428,3	92,9	233,8	653,4	0,64	0,47
	Linajell	419,7	86,2	239,3	660,1		
AHim	Linaje I	255,4	70,8	155,7	395,1	0,15	1,45
	Linajell	236,2	60,0	158,9	460,4		
AnEx	Linaje I	72,6	19,4	40,1	109,5	0,28	-1,08
	Linajell	77,2	21,1	40,4	133,7		
CSp	Linaje I	14,9	5,6	7,3	27,3	0,01	-2,50
	Linajell	18,4	7,5	8,0	34,3		
LgSp	Linaje I	35,0	5,7	26,0	46,7	≤0,01	-3,36
	Linajell	38,9	5,4	26,2	51,3		
AnSp	Linaje I	16,5	2,5	12,2	21,1	0,05	-2,00
	Linajell	17,5	2,0	13,1	22,0		

Tabla 2.9- Media, desviación estándar (SD), mínimos y máximos y valores de probabilidad (p-valor) para el análisis estadístico de t-Student de los caracteres anatómicos cuantitativos. En negrita se indican los valores con p-valor significativos para la t-Student (p-valor ≤ 0.05).

A continuación se muestran fotografías tomadas para los talos y las esporas de ambos linajes -Fig. 2.6.a y b y Fig. 2.7.a y b- y las comparaciones por gráficos de cajas y bigotes de los caracteres anatómicos cuantitativos -Fig. 2.8-.

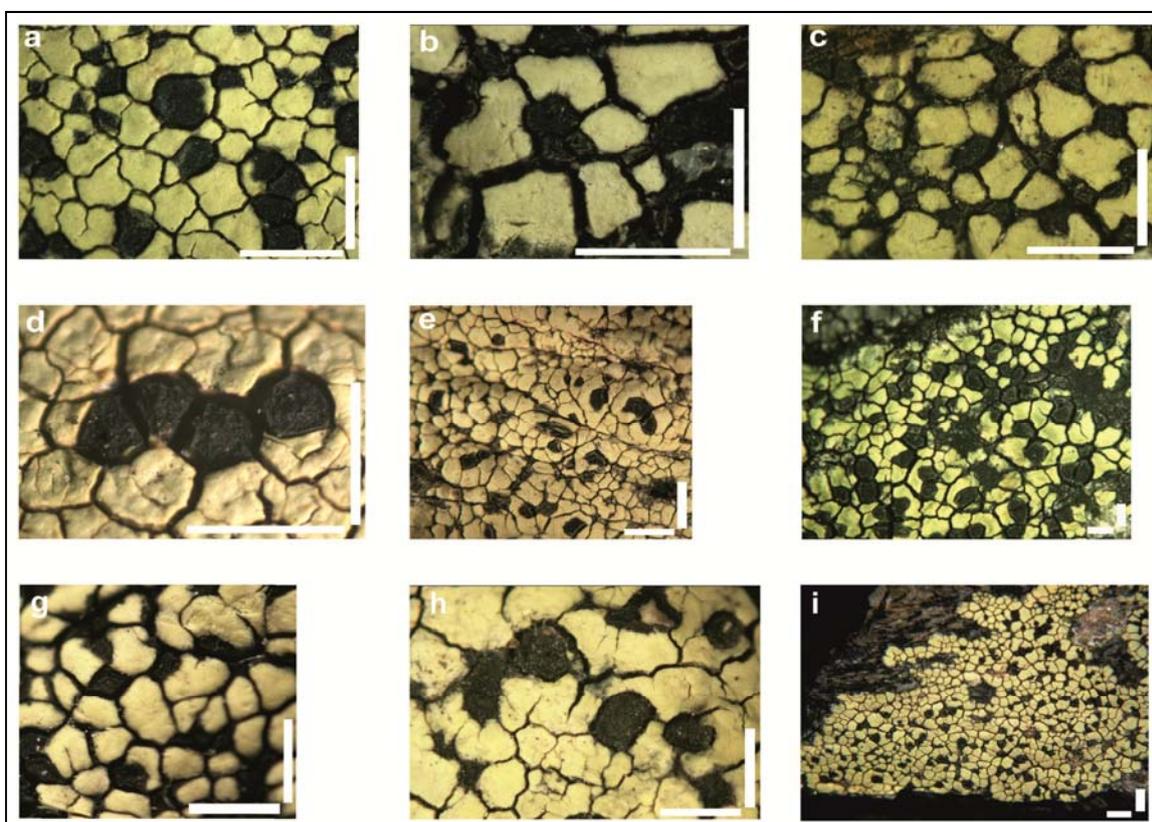


Figura 2.6.a.- Talos de las diferentes especies y subespecies del grupo de *Rhizocarpon geographicum* ubicadas en el Linaje I. a: *R. geographicum* subsp. *diabasicum* MAF-16733; b: *R. geographicum* subsp. *frigidum* MAF-16709; c: *R. geographicum* subsp. *geographicum* MAF-16718; d: *R. geographicum* subsp. *prospectans* MAF-16726; e: *R. lecanorinum* MAF-16731; f: *R. macrosporum* MAF-16737; g: *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16638; h: *R. sublucidum* MAF-16707; i: *R. tinei* MAF-16685. Escala= 1mm.

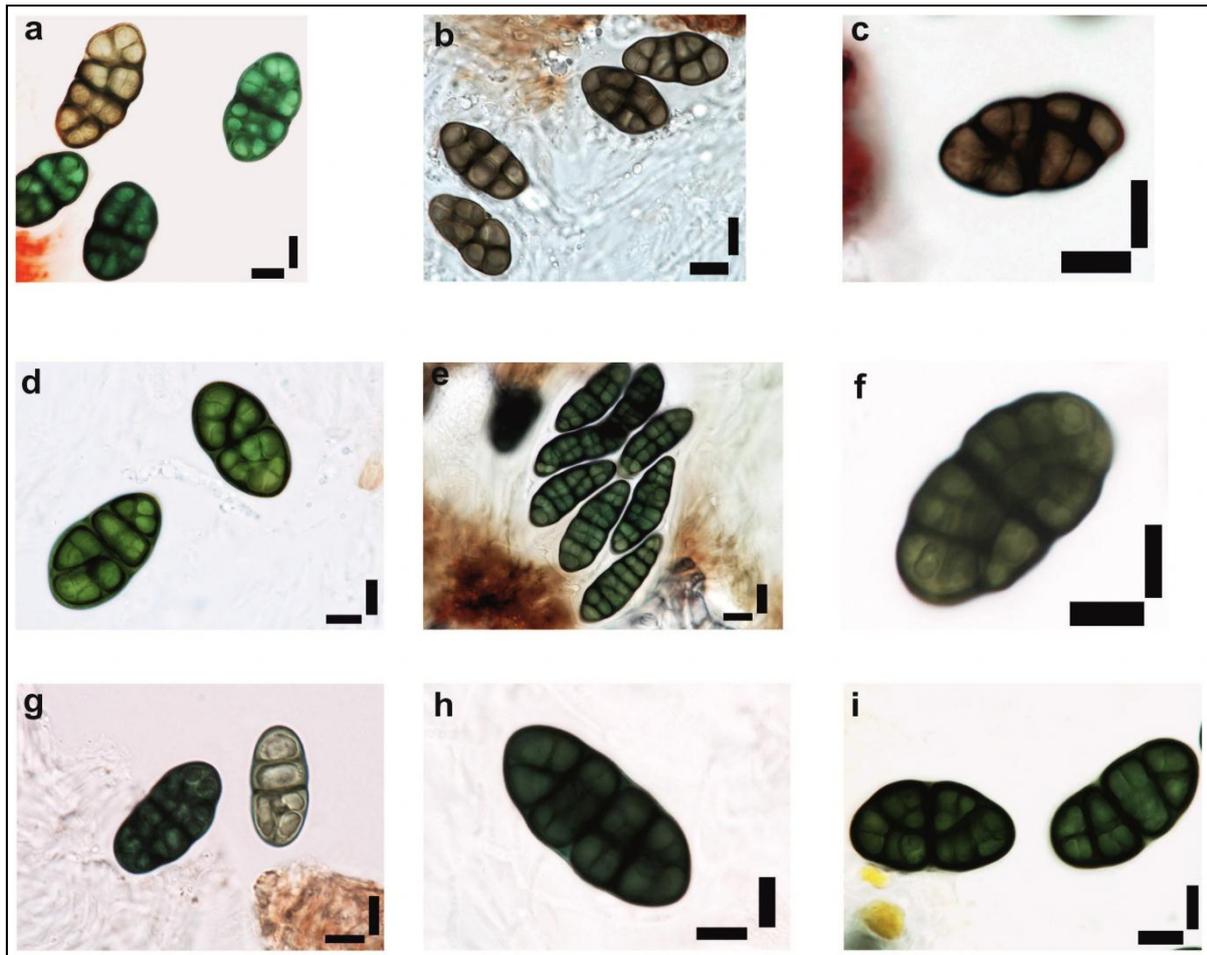


Figura 2.6.a .- Esporas de las diferentes especies y subespecies del grupo de *Rhizocarpon geographicum* ubicadas en el Linaje I. a: *R. geographicum* subsp. *diabasicum* MAF-16730; b: *R. geographicum* subsp. *frigidum* MAF-16732; c: *R. geographicum* subsp. *geographicum* MAF-16719; d: *R. geographicum* subsp. *prospectans* MAF-16659; e: *R. lecanorinum* MAF-16731; f: *R. macrosporum* MAF-16737; g: *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16638; h: *R. sublucidum* MAF-16707; i: *R. tinei* MAF-16706. Escala= 10µm.

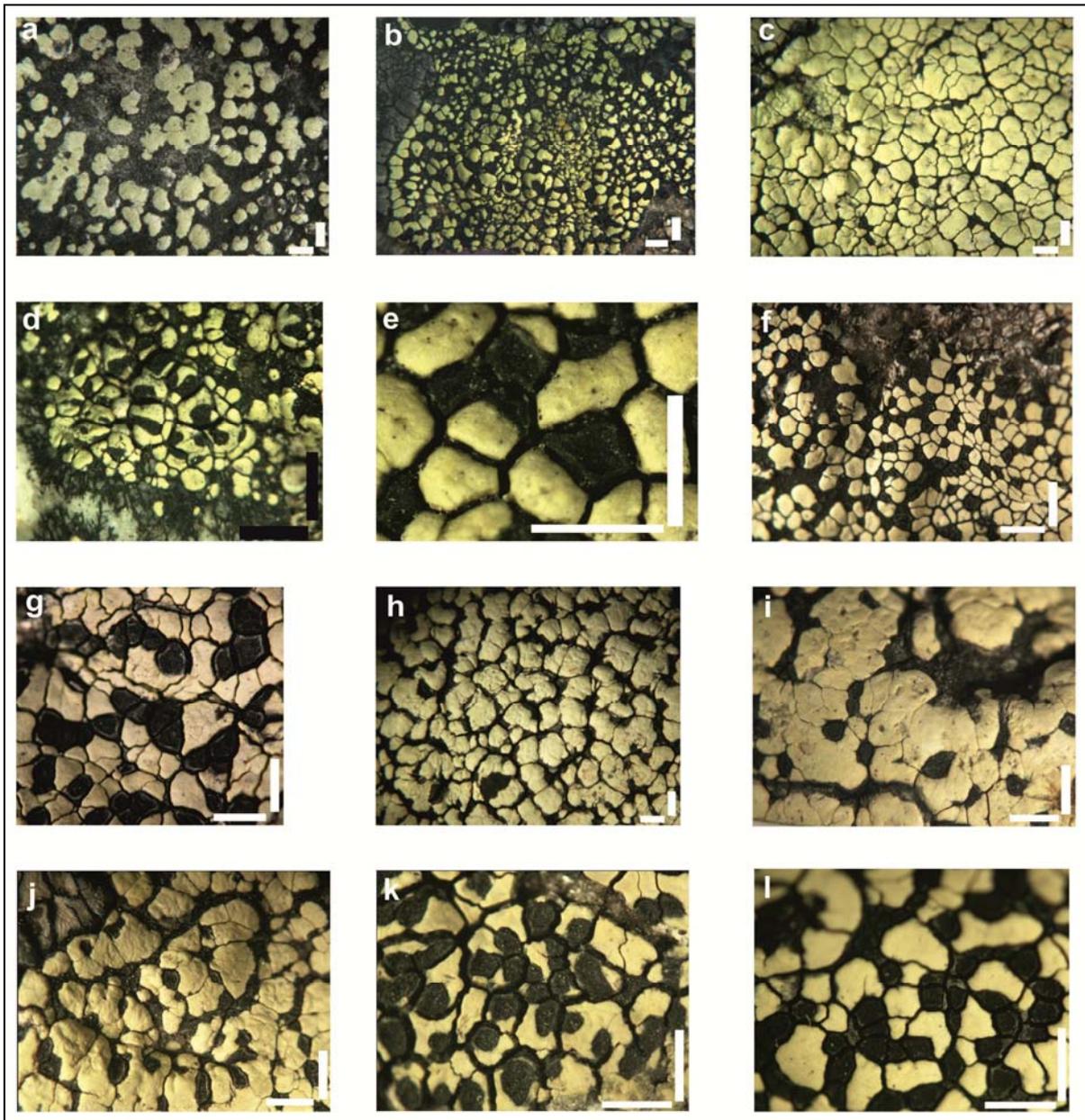


Figura 2.7.a.- Talos de las diferentes especies y subespecies del grupo de *Rhizocarpon geographicum* ubicadas en el Linaje II. a: *R. drepanodes* MAF-16738; b: *R. geographicum* subsp. *frigidum* MAF-16666; c: *R. geographicum* subsp. *prospectans* MAF-16692; d: *R. lecanorinum* MAF-16705; e: *R. macrosporum* MAF-16700; f: *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16650; g: *R. riparium* subsp. *riparium* MAF-16636; h: *R. saanaënse* MAF-16714; i: *R. sphaerosporum* MAF-16728; j: *R. sublucidum* MAF-16680; k: *R. tavaresii* MAF-16708; l: *R. tinei* MAF-16654. Escala= 1mm.

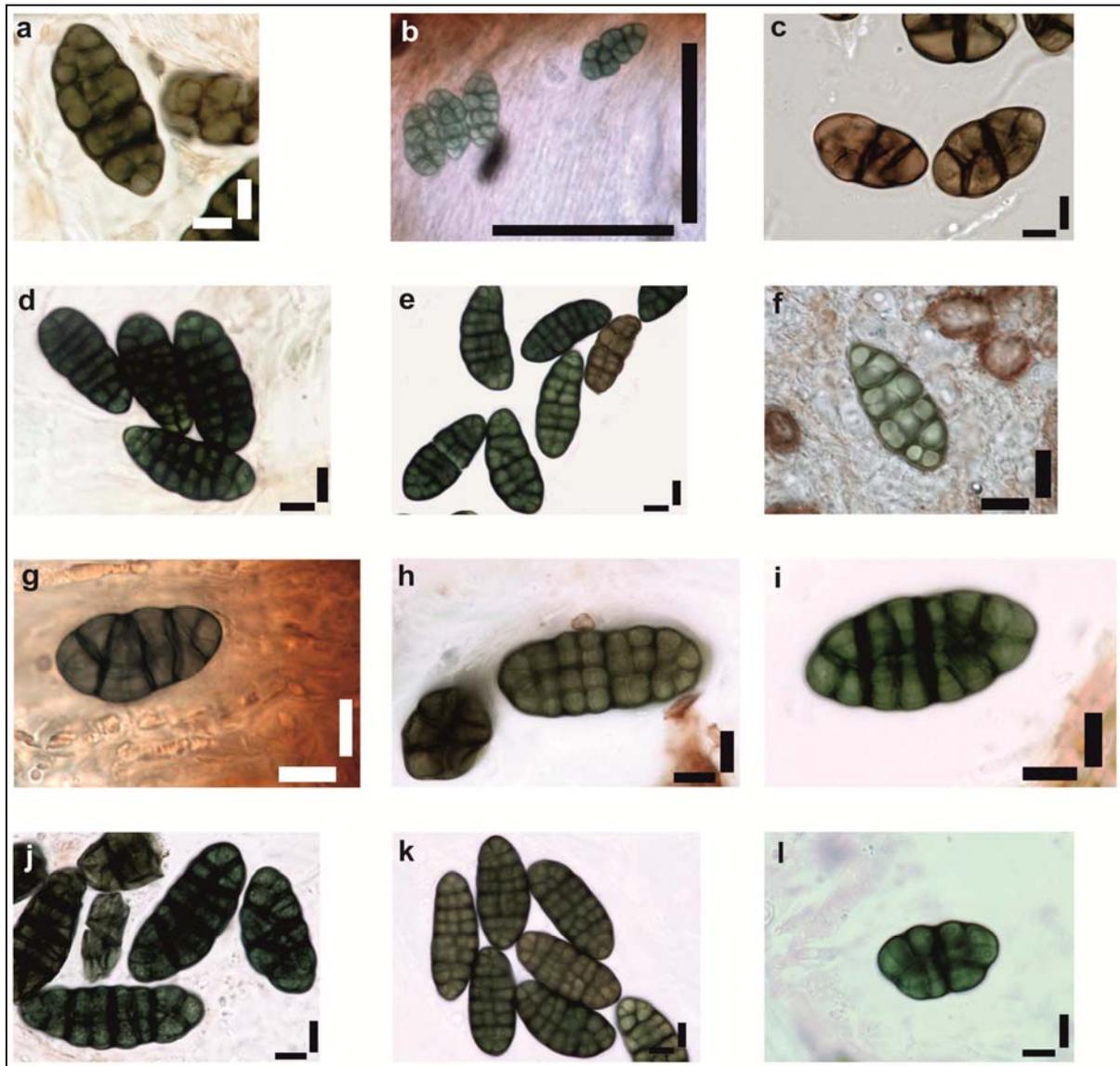


Figura 2.7.b.- Esporas de las diferentes especies y subespecies del grupo de *Rhizocarpon geographicum* ubicadas en el Linaje II. a: *R. drepanodes* MAF-16738; b: *R. geographicum* subsp. *frigidum* MAF-16646; c: *R. geographicum* subsp. *prospectans* MAF-16692; d: *R. lecanorium* MAF-16705; e: *R. macrosporum* MAF-16711; f: *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16650; g: *R. riparium* subsp. *riparium* MAF-16640; h: *R. saanaense* MAF-16714; i: *R. sphaerosporum* MAF-16728; j: *R. sublucidum* MAF-16680; k: *R. tavaresii* MAF-16708; i: *R. tinei* MAF-16654. Escala= 10 μ m, excepto para la fotografía b: escala= 100 μ m

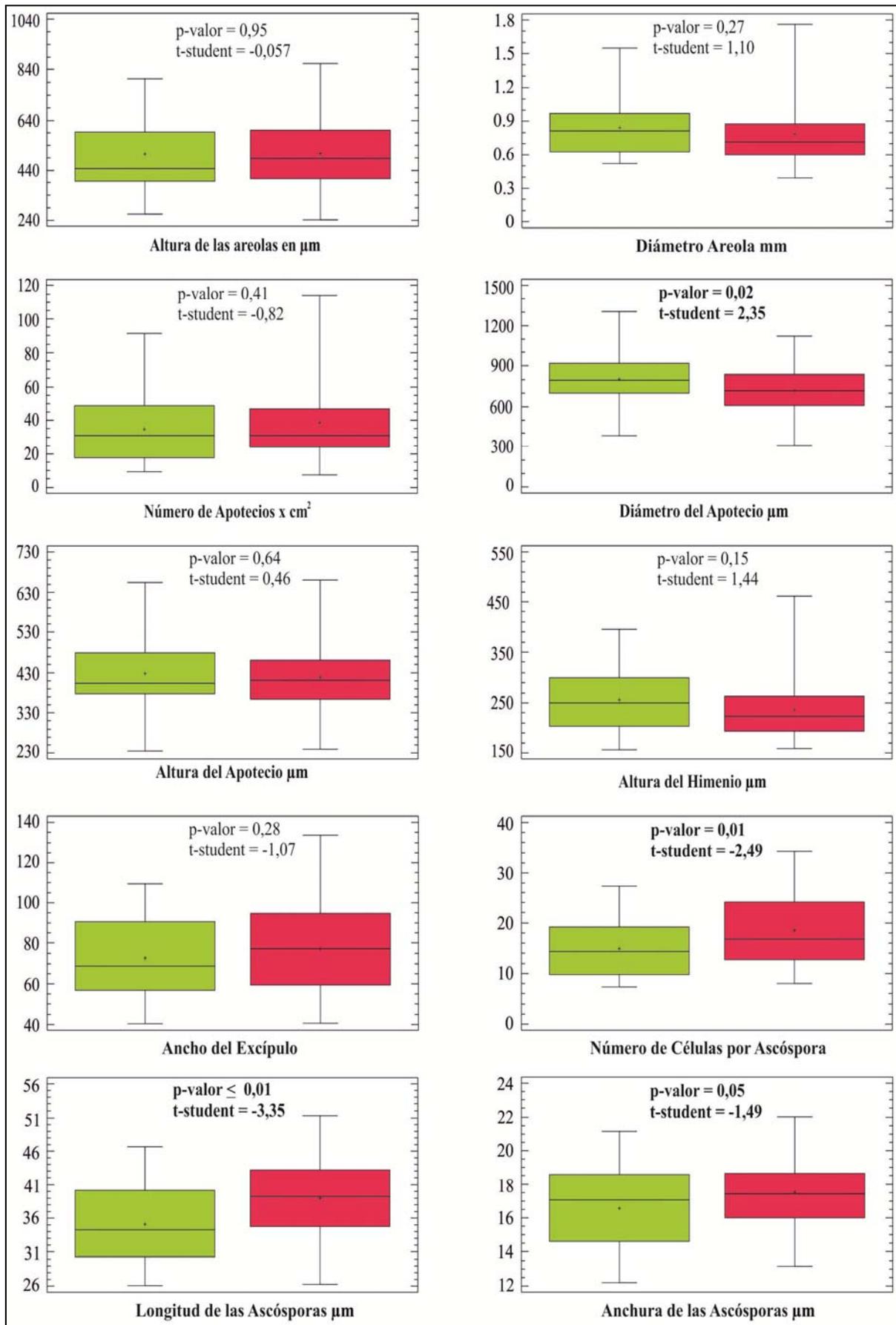


Figura 2.8.- *Box-plots* que reflejan la variabilidad de los caracteres cuantitativos dentro de cada linaje - Linaje I en verde y Linaje II en Rojo-. La distribución de los datos esta expresada en medias \pm la desviación estándar (Media: +, SD: cajas, Mediana: línea longitudinal dentro de la caja), los extremos (\mp) expresan el máximo y el mínimo de las medidas tomadas.

-Clasificación por Clusters: La Figura 2.9 muestra las agrupaciones realizadas por el análisis a partir del punto en que el análisis ha agrupado los 100 individuos incluidos en el estudio en 50 grupos (2 indiv. por grupo). En el momento en que las distancias entre los grupos son mayores, es decir existe menos afinidad entre los individuos incluidos en cada clase, y las diferencias entre los caracteres anatómicos (considerados como variables) son más amplias, el análisis genera distintas clases. En nuestro caso estas diferencias son significativas a partir de la división en 7 clases diferentes -Fig. 2.9 y Apéndice 2A apartado C-.

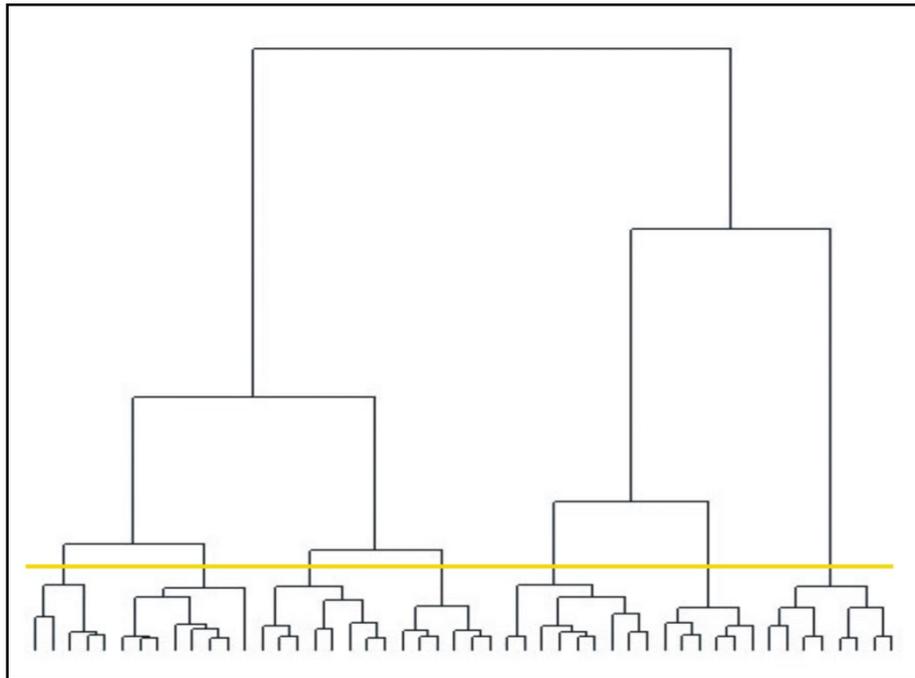


Figura 2.9.- Dendograma obtenido del análisis de Cluster. Las agrupaciones se hicieron por afinidad de las variables categóricas a partir de los 100 individuos incluidos en el estudio, representados a partir de la agrupación en 50 grupos. La línea amarilla indica el momento en que las agrupaciones dieron diferencias significativas.

De todas las divisiones realizadas -en total 5 análisis de *cluster* con 7, 5, 4, 3 y 2 clases distintas cada uno- se eligió el *cluster* con 4 clases distintas por tener los valores más significativos para el p-valor con respecto a la χ^2 , -Tabla 2.10-. Para los valores obtenidos para el resto de *clusters* ver Apéndice 2 apartado C. 1.

Tabla 2.10.- Tabla resumen valores de Chi-cuadrado (χ^2) del análisis de *cluster* para la agrupación en 4 Clases.

	Grados de libertad	Valor	p-valor
χ^2	3	11.59	0.0089
χ^2 Likelihood Ratio	3	11.67	0.0086

En la Tabla 2.11 observamos la frecuencia y los porcentajes de aparición de individuos de cada linaje en cada agrupación realizada para el *cluster* de 4 clases. Los porcentajes de cada fila se refieren al porcentaje de individuos del linaje, mientras que el porcentaje por columna se refiere al porcentaje de individuos de cada clase.

Tabla 2.11.- Clasificación por Clusters para la agrupación en 4 clases: Porcentaje y frecuencia de individuos -Relación entre variables categóricas (Linajes) y las clases-. En negrita se indican los porcentajes más elevados de aparición de cada linaje y porcentajes más altos de cada clase.					
Frecuencia	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4	Total Individuos por Linaje
Porcentaje Fila					
Porcentaje Columna					
LINAJE I	15	7	6	8	36
	41,6%	19,4%	16,6%	22,2%	
	51,7%	25%	20%	61,5%	
LINAJE II	14	21	24	5	64
	21,9%	32,8%	37,5%	7,8%	
	48,3%	75%	80%	38,4%	
Total Individuos en cada Clase	29	28	30	13	100

El número más elevado de individuos del Linaje I se localizan en la Clase 1 del *cluster*, que contiene 15 individuos del linaje, es decir un 51,7 % de los individuos de la clase 1 se encuentran en el Linaje I. La clase 4 contiene 13 individuos que aparecen con una frecuencia de 8 en el Linaje I; el 61,5% de los individuos de la clase 4 concurren en el Linaje I. Mientras la frecuencia más elevada de individuos del Linaje II se halla en la clase 3, 24 individuos, teniendo en cuenta que la clase comprende 30 individuos, el 80% se encontrarían en el Linaje II. La clase 2 está representada en un 75% en el Linaje II con 21 individuos de los 28 que contiene la clase.

Así, las clases del análisis de *cluster* que son más representativas para el Linaje I son la clase 1 con un 41,6% de los individuos y la clase 4 con un 22,2% de individuos totales del linaje, mientras que para el Linaje II serían la clase 2 con un 32,8% de individuos y la clase 3 con un 37,5% de individuos del linaje.

Cada clase quedaría definida o ilustrada por una serie de caracteres anatómicos químicos cualitativos (variables) que se han estudiado -Tabla 2.12-, a excepción de la clase 1, en la que ninguno de los caracteres morfológicos o químicos cualitativos llegan a ser lo suficientemente significativo como para definir la clase dentro del análisis de *cluster* para 4 clases.

Para la clase 2 la forma convexa de la areola sería el carácter morfológico más ilustrativo, que aparece en un 75% de los 28 individuos incluidos en dicha clase. La clase 3 queda definida por el himenio hialino que aparecería en un 73,3% de los 30 individuos y para la clase 4 sería la forma en collar de las areolas aunque sólo estaría presente en un 7,69% de los 8 individuos de la clase, es decir en un porcentaje demasiado bajo.

Tabla 2.12.- Análisis de *Cluster* para la agrupación en 4 clases: Descripción de las variables ilustrativas (caracteres cualitativos).

Clase	Variable / Estado observado	% Aparición Variable en la Clase	% Aparición Variable en el Set	Test-valor	p-valor
1	---	---	---	---	---
2	Forma Areola / Convexa	75%	52%	2.68	0.004
3	Color Himenio / Hialino	73.3%	88%	-2.52	0.006
4	Areolas Collar / Ninguna	7.69%	42%	-2.53	0.006

El análisis de *cluster* proporciona una descripción de los caracteres anatómicos cuantitativos con p-valores significativos, recordemos que eran 10 (AAr, DAr, NAp, DAp, AAP, AHim, AnEx, CSp, LgSp y AnSp), que han intervenido en la división en 4 clases, dichos caracteres son considerados por el análisis como variables activas -Apéndice 2 apartado C. 2-.

En la clase 1 intervienen todos los caracteres anatómicos cuantitativos como variables activas a excepción del número de apotecios por cada 3 cm² de talo, con medias por debajo de la media general. Las variables activas en la clase 2 son la altura de la areola, el diámetro del apotecio y la altura del apotecio con medias por encima de la general y la longitud de las esporas, el número de células por espora y el número de apotecios por cada 3 cm² de talo con medias por debajo de la general.

En la clase 3 las variables significativas con medias superiores a la general son el número de células por espora, la longitud y la anchura de las esporas y el número de apotecios por cada 3 cm² de talo, mientras que encontramos como variables activas con medias inferiores a la general a los caracteres altura del apotecio y de la areola. En la clase 4 todas las variables activas que son significativas tienen medias por encima de la general y son 7 caracteres anatómicos cuantitativos: AAr, DAr, DAp, AAP, AHim, LgSp y AnSp.

Las Figuras 2.10.a y b ilustran el análisis de *cluster* para 4 clases contrastado con la topología del árbol filogenético para cada linaje, en ellas podemos ver como las clases se distribuyen a lo largo de las ramas del árbol filogenético de cada linaje. En sendas figuras se han marcado los clados respaldados por ambos linajes filogenéticos -Clado A, B, C, D, E, F y G- que corresponderían por completo a una de las clases obtenidas del análisis de *cluster* para 4 clases, cada una de las cuales ha sido diferenciada por un color -Apéndice 2 apartado C. 3-

-Análisis Discriminante: El análisis corrió dos modelos diferentes, uno en el que se incluían todas las variables cuantitativas, es decir los 10 caracteres anatómicos cuantitativos, y otro modelo en el que se utilizan únicamente las variables cuantitativas con valores significativos para los test estadísticos de Wilks' λ y el F-valor. El modelo elegido fue este último por ser más conservador y realista. Los resultados generales para ambos modelos se pueden consultar en el Apéndice 2 apartado D. Los caracteres anatómicos escogidos por el análisis como variables significativas -Tabla 2.13-, fueron el diámetro del apotecio, la altura del apotecio, la altura del himenio y la longitud de las esporas. Las variables seleccionadas fueron 4, las clases 2 (2 linajes), el tamaño total de la muestra fue 100 y los grados de libertad (DF) 99.

Tabla 2.13.- Análisis Discriminante: Selección Caracteres morfológicos como variables significativas en el análisis en base a sus valores estadísticos para Wilks' λ , F-valor y p-valor.

Carácter	Wilks' λ	F-valor	p-valor
DAP	0,82	8,74	$\leq 0,001$
AAp	0,75	5,76	$\leq 0,001$
AHim	0,79	3,30	$\leq 0,001$
LgSp	0,89	11,27	0,0011
Total= 4 Variables	2 Clases	Nº Total de muestras=100	DF total = 99

En base a estas 4 variables y a las 2 clases en las que el análisis debe discriminar, se obtuvieron dos grupos a los que hemos denominado Grupo 1 (que sería el Linaje I) y Grupo 2 (que sería el Linaje II) del análisis discriminante. Ambos grupos fueron contrastados por el análisis con los linajes obtenidos del análisis filogenético del grupo de *R. geographicum*. Los resultados -Tabla 2.14- muestran como 12 individuos del Linaje I, un 33,3% de individuos en base a los caracteres morfológicos empleados por el análisis, deberían encontrarse en el Grupo 2. De la misma forma 17 individuos del Linaje II, el 26,5% de los individuos, deberían pertenecer al Grupo 1.

Tabla 2.14.- Análisis Discriminante: Número de observaciones y porcentaje de clasificación.			
	Grupo 1 del A. Discriminante	Grupo 2 del A. Discriminante	Total Linajes Filogenéticos
LINAJE I	24 66,7%	12 33,3%	36 100%
LINAJE II	17 26,5%	47 73,4%	64 100%
Total Grupos A. Discriminante	41 41%	59 59%	100 100%

La inclusión de un individuo u otro en uno de los dos grupos va a depender de que la probabilidad posterior obtenida del análisis discriminante sea mayor o igual a 0,50 (Apéndice 2 apartado D). En las Figuras 2.10.a y b se ilustra sobre los árboles filogenéticos que individuos no deberían de incluirse en ese linaje si no en el otro así como los clados monofiléticos que por completo deberían pertenecer al otro grupo según los caracteres significativos seleccionados por el análisis discriminante (Clado 1, 2 y 3).

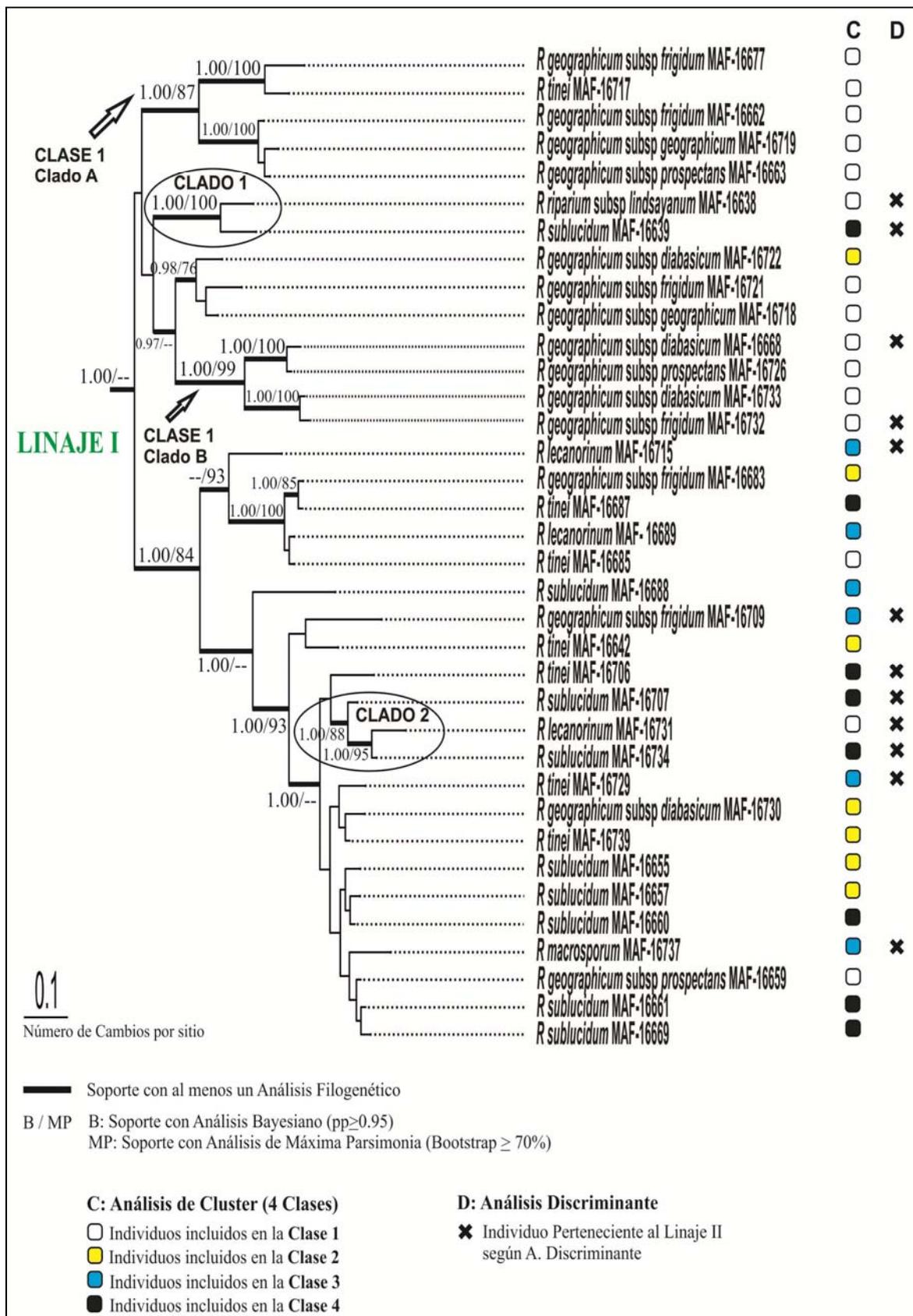


Figura 2.10.a.- Árbol Filogenético del Linaje I del grupo de *R. geographicum* en la Península Ibérica comparado con análisis estadístico de *Cluster* y Discriminante. Árbol 50% Majority Rule a partir de 29000 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ de las regiones ITS nu y LSU mt. Se han marcado los clados respaldados por ambos análisis filogenéticos que pertenecerían por completo a una de las clases obtenidas por el análisis de *cluster* para 4 clases (Clado A y B) o al otro grupo (Linaje II) según el análisis discriminante (Clado 1 y 2).

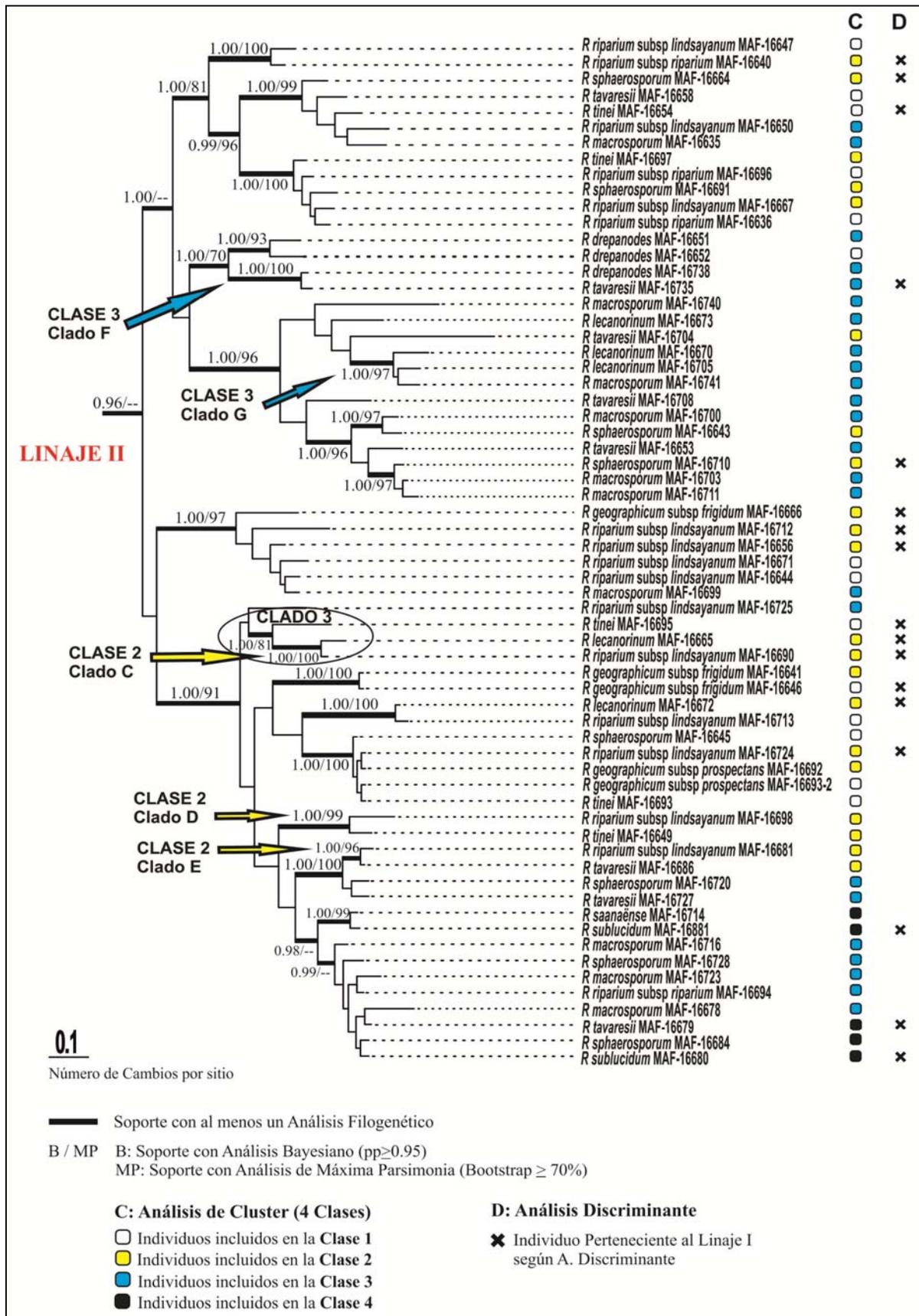


Figura 2.10.b.- Árbol Filogenético del Linaje II del grupo de *R. geographicum* en la Península Ibérica comparado con análisis estadístico de *Cluster* y Discriminante. Árbol 50% *Majority Rule* a partir de 29000 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ de la regiones ITS nu y LSU mt. Se han marcado los clados respaldados por ambos análisis filogenéticos que pertenecerían por completo a una de las clases obtenidas por el análisis de *cluster* para 4 clases (Clado C, D, E, F y G) o al otro grupo (Linaje I) según el análisis discriminante (Clado 3).

DISCUSIÓN

Análisis filogenético

El análisis filogenético basado en los *loci* considerados nos permite afirmar que el subgénero *Rhizocarpon* (Fig. 2.2 y 2.3) podría resultar ser polifilético: individuos de la especie *R. superficiale* subsp. *superficiale* incluidos en el grupo *Superficiale*, con areolas amarillas y ácido rhizocárpico, aparecen junto con otros taxones del subgen. *Phaeothallus* fuera de lo que sería el subgen. *Rhizocarpon*. De acuerdo con el concepto actual del subgénero (Runemark 1956a; Thomson 1967; Hafellner 1984), se habría esperado que estas muestras formasen un clado monofilético junto con el resto de especies incluidas en el grupo *Superficiale*. En su tesis doctoral, Clayden (2004) sugería que debido a la peculiar ontogenia del apotecio y de las ascósporas *R. superficiale* podría estar más cerca filogenéticamente de *Catolechia wahlenbergii* (Ach.) Flot. que de otras especies amarillas del género *Rhizocarpon*.

A falta de incluir más muestras del subgénero *Phaeothallus* y de otros géneros o familias cercanas al género *Rhizocarpon* como por ejemplo *Catillariaceae* o *Sporastatia*, junto con el análisis de otros genes más adecuados para niveles taxonómicos más elevados, nuestros resultados indican que a pesar de contener ácido rhizocárpico y areolas amarillas, la especie *R. superficiale* subsp. *superficiale* parece encontrarse más cerca del subgénero *Phaeothallus* que del subgénero *Rhizocarpon* (Fig. 2.3), siendo dicho grupo polifilético. Ihlen y Ekman (2002) ya indicaron que tanto el género *Rhizocarpon* como el subgénero *Rhizocarpon* no se encuentran bien definidos y necesitan una revisión en profundidad ya que la clasificación realizada por Thomson (1967) que divide el género en especies amarillas -con ácido rhizocárpico, subgénero *Rhizocarpon*- y especies marrones y grises -sin ácido rhizocárpico, subgénero *Phaeothallus*- es artificial e inconsistente. No siempre son los caracteres químicos los más adecuados para separar subgéneros o géneros de líquenes, como ocurre con los géneros *Neofuscelia* y *Xanthoparmelia*, las diferencias químicas observadas en el córtex superior no son caracteres suficientes para la separación de ambos géneros (Elix *et al.* 1986; Blanco 2004).

Dentro del subgénero *Rhizocarpon* encontramos los 4 grupos incluidos en él (Runemark 1956a; Thomson 1967; Poelt 1988): el grupo *Alpicola*, el grupo *Viridiatrum*, el grupo de *R. geographicum* y el grupo *Superficiale*, en el que se incluirían el resto de individuos analizados formando un clado monofilético, pero como se ha indicado anteriormente, este último grupo no está bien definido y precisa de ser revisado (Clayden 2004).

Dentro del grupo de *R. geographicum* se definen dos grandes clados monofiléticos, el Linaje I y el Linaje II (Fig. 2.2), siendo ambos conjuntos metapoblaciones compuestas por subpoblaciones conectadas (Levins 1970; Hanski y Gaggiotti 2004); en cuanto al reconocimiento de especies, puede considerarse como tal no la “metapoblación” entera (el linaje) sino un segmento de esta (De Queiroz 2007). Si se atiende por ejemplo al concepto unificado de especie (De Queiroz 2007) para intentar delimitarlas, es preciso tener en cuenta diferentes propiedades posibles en las especies como son, además de la propiedad filogenética que estamos comentando (Rosen 1979; Donoghue 1985; Mishler 1985), otras propiedades. Así las fenotípicas, similitud morfológica de los organismos incluidos (Templeton 1989, 1998), las ecológicas y geográficas, es decir el que los individuos compartan el mismo nicho o zona adaptativa (Van Valen 1976; Andersson 1990) y las evolutivas, es decir que compartan tendencia y rol evolutivo único (Simpson 1951; Wiley 1978; Mayden 1997). En este contexto se discuten los próximos apartados.

Análisis contrastado de los caracteres anatómicos macro-morfológicos y químicos la topología de los árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos -Fig. 2.4 y 2.5- así como los valores de pp y *bootstrap* para ambos linajes son los obtenidos del análisis bayesiano y de MP sin incluir al grupo *Viridiatrum*. La diferencia fundamental entre incluir este grupo y no incluirlo radica en el hecho de que la pp para el Linaje II disminuye significativamente (de 0.96 excluyendo el grupo a 0.87 incluyéndolo). Esto es posiblemente debido a la proximidad evolutiva del grupo *Viridiatrum* al grupo de *R. geographicum*: ambos grupos son los únicos del subgénero con ascósporas muriformes, carácter anatómico al que se ha atribuido gran relevancia taxonómica (Räsänen 1942a, 1943a y b, 1949b; Runemark 1956a; Thomson 1967; Feuerer 1978; Poelt 1988; Ihlen & Ekman 2002; Clayden 2004).

Es muy probable que al incluir más individuos del grupo *Viridiatrum* y del grupo de *R. geographicum* la probabilidad posterior y el *bootstrap* del Linaje II aumente sin tener que recurrir a la exclusión del grupo *Viridiatrum* (ver Capítulo 5).

En general en las Figuras 2.4.a y b se observa que no aparece ningún patrón de distribución entre las localidades muestreadas, i.e. la distribución geográfica, y la aparición de caracteres macro-morfológicos y químicos y el estado en que estos aparecen. En el Linaje I encontramos distintos clados monofiléticos pequeños en los que se ha tratado de encontrar algún carácter que pudiera considerarse diagnóstico para dichos clados y así pudieran ser definidos como taxones dentro del grupo. Por ejemplo el clado formado por *R. geographicum* subsp. *frigidum* MAF-16677 (SN) y *R. tinei* MAF-16717 (Pi) sería definido por el carácter apotecio cóncavo. Sin embargo este mismo carácter se puede encontrar en muchos otros clados de ambos linajes y es común a diferentes especies y subespecies del grupo de *R. geographicum*. En consecuencia no podría utilizarse por sí sólo como carácter diagnóstico del clado.

Lo mismo ocurre con las areolas en forma de collar y los apotecios circulares en *R. lecanorinum* MAF-16731 y *R. sublucidum* MAF-16734 (ambos de la SF). Aunque *R. sublucidum* en principio debería de carecer de este tipo de areolas, se identificó como tal por ser PD + amarillo en la médula, K + en el epihimenio y por tener areolas, apotecios y ascósporas grandes (Runemark 1956a; Poelt 1988). También en el clado formado por *R. geographicum* subsp. *diabasicum* MAF-16668 (G) y *R. geographicum* subsp. *prospectans* MAF-16726 (Pi) se podría acudir a los caracteres hipotalo ausente y apotecios circulares, pero igualmente los apotecios circulares son comunes a otras especies como *R. lecanorinum* o *R. drepanodes* y el hipotalo ausente aparece también en individuos de *R. geographicum* subsp. *geographicum*, *R. tinei* y *R. sublucidum* dispersos en otras ramas del árbol filogenético.

En cuanto al Linaje II -Fig. 2.4.b- los caracteres macro-morfológicos que podrían ser considerados como caracteres diagnósticos para clados monofiléticos pequeños serían: areolas con forma convexa, areolas en forma de collar, apotecios cóncavos y apotecios circulares, pero como ocurría en el Linaje I estos caracteres se vuelven poco consistentes ya que las especies responden a patrones polifiléticos en el árbol filogenético. Por ejemplo *R. geographicum* subsp. *frigidum* MAF-16666 (G), *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16712 (SE), *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16656 y MAF-16671 (ambos de la localidad Los Barrerones, G), *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16644 (N) y *R. macrosporum* MAF-

16699 (L), forman un único clado y tienen como carácter común los apotecios cóncavos, sin embargo este carácter es compartido por varias especies y subespecies de los dos linajes.

El carácter areolas convexas lo encontramos como carácter común en el clado formado por los individuos de *R. geographicum* subsp. *frigidum* MAF-16641 y MAF-16646 (ambos de la localidad N), pero también en el clado en el que se hallan los individuos *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF- 16698 (L) y *R. tinei* MAF- 16649 (N) y en el de *R. saanaënse* MAF-16714 (Hu) y *R. sublucidum* MAF-16881(Hu), por lo que por sí sólo no serían un buen carácter para definir dichos clados como taxones.

Un curioso ejemplo más sería el de los individuos de *R. drepanodes* (MAF-16651 Ba y MAF-16652 C y MAF-16738 SF) que junto con *R. tavaresii* MAF-16735 (SF), forman un clado bien respaldado estadísticamente donde las dos especies tienen apotecios cóncavos y circulares. Sin embargo existen diferencias en otras características morfológicas dado que otros rasgos como la convexidad y forma en collar de las areolas son propios de *R. drepanodes* pero no de *R. tavaresii*.

Como puede verse, caracteres morfológicos a los que se ha dado gran valor taxonómico, como areolas en forma de collar y la forma claramente circular de los apotecios, se encuentran irregularmente distribuidos en todo el árbol filogenético y en ambos clados. Si se usan las dos principales referencias bibliográficas para identificación (Runemark 1956a; Poelt 1988), los caracteres señalados (areolas convexas y en forma de collar, apotecios cóncavos y circulares y también presencia/ausencia de hipotalo) son los determinantes para la identificación de muchas de las especies del grupo. Y como se ha venido discutiendo, no se ajustan al modelo filogenético reflejado en el árbol, sino que atienden a patrones polifiléticos.

Con respecto a la quimiosistemática, en el Linaje I -Fig. 2.5a- todos los individuos con reacción KOH- (*R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16638 N, *R. lecanorinum* MAF-16715 Hu, *R. lecanorinum* MAF-16689 SN y *R. lecanorinum* MAF-16731 SF) se distribuyen en diferentes ramas del linaje, además de aparecer a 4 localidades diferentes. Los individuos con reacción Pd- del Linaje II -Fig. 2.5.b- se aglutinan principalmente en 2 clados: el primero de ellos contiene sólo dos individuos, *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16698 del Pico Lobo y *R. tinei* MAF-16649 de la Najarra, el segundo con 4 individuos; *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16681, *R. tavaresii* MAF-16686 ambos de Sierra Nevada y *R. sphaerosporum* MAF-16720 y *R. tavaresii* MAF-16727 los dos de la localidad Subida al Montardo (Pi). El resto de individuos Pd- (tres) se encuentran dispersos en diferentes ramas

del linaje, además de haber sido identificados como 3 especies diferentes (*R. tavaresii*, *R. riparium* ssp *riparium* y *R. macrosporum*) pertenecientes a 3 localidades distintas (CR, L y Hu respectivamente). Por tanto el carácter Pd- no muestra relación con los resultados filogenéticos ni con la geografía de los individuos.

El ácido psorómico en el Linaje I (Fig. 2.5.a) no está presente sólo en 2 individuos de 2 localidades distintas: *R. tinei* MAF-16642 N y *R. lecanorinum* MAF-16731 SF que no forman un clado monofilético. En el Linaje II (Fig. 2.5.b) este ácido no se encuentra en 18 individuos, 14 de ellos aparecen en 5 clados distintos y que contienen entre 2 y 4 individuos cada uno de especies y localidades diferentes. Sólo en el caso del clado formado por *R. sphaerosporum* MAF-16710, *R. macrosporum* MAF-16703 y *R. macrosporum* MAF-16711 existe una correlación geográfica: los 3 individuos pertenecen a la misma localidad la Sierra de Estrella (SE). Además dichos individuos tienen reacción positiva al Pd en la médula de color rojo teja, no reaccionan positivamente a la KOH en el epihimeno y presentan ácidos del complejo del ácido estíctico, además del propio ácido estíctico, por lo que podría tratarse de un quimiotipo si no fuera porque se trata de individuos de 2 especies diferentes determinadas en base al carácter morfológico areolas en forma de collar presentes en *R. sphaerosporum* pero ausentes en *R. macrosporum*.

El ácido girofórico está presente en 9 individuos de 6 especies distintas procedentes de 4 localidades: *R. tavaresii* MAF-16704 (SE), *R. tinei* MAF-16695 (L), *R. sphaerosporum* MAF-16645 (N), *R. geographicum* subsp. *prospectans* MAF-16692 (L), *R. geographicum* subsp. *prospectans* MAF-16693-2 (L), *R. tinei* MAF-16693 (L), *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16698 (L), *R. tinei* MAF-16649 (N) y *R. macrosporum* MAF-16678 (SN). De estos 9 individuos, 5 proceden de la localidad Pico del Lobo (L).

Así, el ácido más importante presente en el metabolismo secundario en el grupo de *R. geographicum* es el ácido rhizocárpico (derivado del ácido pulvínico) seguido por el ácido psorómico (depsidona derivada del β -Orcinol). Se observa además la presencia de más compuestos químicos que aparecerían con menor frecuencia: el complejo del ácido estíctico y el ácido estíctico (ambos depsidonas derivadas del β -Orcinol), el ácido girofórico (depsido derivado del orcinol) que se observó en otras especies del grupo además de las mencionadas por Timdal y Holtan-Hartwig (1988): *R. sphaerosporum*, *R. macrosporum*, *R. riparium* subsp. *lindsayanum* como ya indicara Runemark (1956a) y además en *R. tavaresii*. El ácido norestíctico y el ácido hipoestíctico (ambos depsidonas derivadas del β -Orcinol) aparecieron en muy baja frecuencia.

No se observó en ningún caso ácido barbático (depsido derivado del β -Orcinol) en especímenes de *R. geographicum* subsp. *diabasicum*, *R. riparium* subsp. *lindsayanum* y *R. sphaerosporum* como indicaran Runemark (1956a) y Poelt (1988) ni en *R. macrosporum* ni *R. geographicum* sp. según Timdal y Holtan-Hartwig (1988).

Por tanto el estudio contrastado de los caracteres químicos de los individuos del grupo de *R. geographicum* deja entrever que no existe correspondencia alguna entre dichos caracteres (propiedades fenotípicas) con las propiedades geográficas. La aparición de ciertos compuestos químicos ni la de quimiotipos dentro del grupo parece no atender a patrones geográficos o a procesos de especiación como se indicaba en trabajos anteriores (Runemark 1956a; Timdal y Holtan-Hartwig 1988; Clayden 2004).

No se ha realizado un estudio sistemático o estadístico de detalle de las propiedades eco-geográficas de los especímenes o de los linajes. Se han tenido en cuenta exclusivamente la localización alpina y subalpina de las estaciones de muestreo, la caracterización del sustrato ácido inicial (granitos, gneises y cuarcitas) y la geografía.

Otros factores como la diferente insolación, exposición al viento, o las condiciones precisas de humedad, de cobertura nival, temperatura y trofia han sido consideradas variables ambiguas en cuanto a la taxonomía (Creveld 1981).

Los individuos del grupo parece que podrían responder a diferentes preferencias ambientales que se deberían más a condiciones micro-climáticas y/o micro-ecológicas que a la ecología general de los hábitats donde se han muestreado, influyendo muy posiblemente sobre las tasas de crecimiento de estos y sobre el desarrollo del líquen en general como ya apuntaban trabajos anteriores (Creveld 1981; Sancho 1986; John 1989; John y Dale 1989; Armstrong 2007; Armstrong 2011).

En síntesis las especies y subespecies del grupo de *R. geographicum* descritas en base a sus caracteres fenotípicos (morfológicos y químicos) y aceptadas a día de hoy, se encuentran distribuidas de manera irregular en todo el árbol filogenético sin que pueda observarse correlación entre caracteres anatómicos macro-morfológicos y los linajes filogenéticos de cualquier rango. Así mismo, tampoco puede establecerse correlación de los linajes filogenéticos detectados con propiedades ecológicas o geográficas.

En el tratamiento de datos efectuado, no puede establecerse correlación entre fenotipos (caracteres morfológicos y químicos) y localidades geográficas muestreadas.

Se recomienda revisar la Introducción general y el Capítulo 1 donde se muestran fotografías de los talos, la descripción de los caracteres anatómicos de cada una de las especies y subespecies estudiadas y las descripciones y fotografías de las especies tipo.

Análisis Estadístico de los Caracteres Morfológicos

-Estadística descriptiva de las variables, t-Student y Correlación de Pearson: los únicos caracteres que resultaron altamente correlacionados fueron la altura del himenio con la altura del apotecio y el número de células por espora con la longitud de estas. Incluso aplicando criterios restrictivos a la hora de interpretar los valores de la Correlación de *Pearson*, la correlación entre la altura del apotecio con la del himenio es significativa, por lo que la relación entre el desarrollo de ambos caracteres es muy estrecha dentro del grupo de *R. geographicum*.

Del mismo modo ocurre con el número de células por espora y la longitud de esta: cuanto más larga es la espora más células tendrán. Sin embargo para la anchura de las esporas el valor de correlación no es lo suficientemente elevado.

Comparando los valores de las medias por el análisis de la t-*Student* ($p\text{-valor} \leq 0.05$) - Tabla 2.9 y Fig. 2.8-, se observó como la mayoría de los caracteres medidos tienen valores no significativos de su p-valor, que se solapan en ambos linajes, i.e. no definirían ninguno de los 2 linajes. El diámetro del apotecio (DAp), utilizado para definir prácticamente todas las especies y subespecies del grupo -Capítulo 1- (Räsänen 1942a y b, 1949b, Runemark 1956a, Feuerer 1978 etc.), se podría utilizar como carácter diagnóstico para cada linaje, sin embargo, debido a que el solapamiento en las medidas tomadas para este carácter no afecta tan sólo a que los valores de las medias sean muy cercanos (803.8 Linaje I y 717.3 Linaje II), si no que de la misma manera ocurre con los valores de la SD (183.6 Linaje I y 171.7 Linaje II), de los máximos (1302.0 Linaje I y 1122.0 Linaje II) y de los valores mínimos (382.6 Linaje I y 310.7 Linaje II), siendo las diferencias entre los valores muy pequeñas, aun teniendo valores significativos para su p-valor, su importancia como carácter diagnóstico sería escasa.

Por otro lado, en el género *Rhizocarpon* (Lyngé 1932; Thomson 1967; Ihlen y Ekman 2002) y en el propio grupo de *R. geographicum* el número de células de las ascósporas así como su longitud y anchura, se cuentan entre los caracteres morfológicos más importantes. Los valores obtenidos para el p-valor de la t-Student sugieren que serían buenos caracteres diagnósticos para diferenciar entre un linaje y otro. Sin embargo las diferencias entre los valores de ambos linajes seguiría siendo pequeña, e.g. CSp media; 14.9 Linaje I y 18.4 Linaje II; CSp valores mínimos; 7.3 Linaje I y 8.0 Linaje II; CSp valores máximos; 27.3 Linaje I y 34.3 Linaje II).

En la monografía de Runemark (1956a) podemos comprobar cómo la longitud de las esporas en distintas especies, por ejemplo *R. lecanorinum* (27-45 µm) y *R. sphaerosporum* (28-45 µm), son demasiado similares como para distinguir únicamente con este carácter entre taxones -Fig. 2.6.a y b, Fig. 2.7.a y b-.

Lo mismo ocurre con el número de células por espora; *R. geographicum* ssp *prospectans*, *R. geographicum* ssp *arcticum*, *R. geographicum* ssp *frigidum* y *R. geographicum* ssp *geographicum* que tienen todas ellas entre 6 y 13 células por espora (Runemark 1956a; Poelt 1988), mientras que podemos encontrar individuos de *R. tinei*, *R. tavaresii* y *R. riparium* ssp *lindsayanum* también con 12 o 13 células por espora (Poelt 1988) - Fig. 2.6.a y b, Fig. 2.7.a y b-.

En consecuencia, el número de células por espora, la longitud y anchura de estas, no se comportan como caracteres discriminantes para diferenciar entre las 14 especies estudiadas y no se pueden proporcionar medidas concretas para cada linaje detectado con los datos disponibles -Fig. 2.6.a y b, Fig. 2.7.a y b, Fig. 2.8-.. También en este caso se trata de caracteres fuertemente homoplásicos que pueden conducir a error en el reconocimiento de las especies e identificación de los individuos, tanto dentro del grupo de *R. geographicum* como del género *Rhizocarpon* (Ihlen y Ekman 2002).

-Clasificación por Clusters: los bajos porcentajes de aparición de los linajes dentro de las clases se deben a que la división dada por el análisis del *cluster* es mayor que el número de linajes que se han definido tras el análisis molecular. Cada clase quedaría definida o ilustrada por una serie de caracteres anatómicos y químicos cualitativos (variables) -Tabla 2.12-. Se corrobora que ninguno de ellos serviría para definir los linajes por razón de su fuerte variabilidad y porque los porcentajes de aparición en el *cluster* son insuficientes.

En la Figura 2.10.a -Linaje I- podemos observar como la Clase 1 forma 2 clados bien respaldados (elevada pp y *bootstrap*): uno de ellos con 5 individuos, el Clado A, de 4 especies y subespecies morfológicas distintas (*R. tinei*, *R. geographicum* subsp. *prospectans*, *R. geographicum* subsp. *frigidum* y *R. geographicum* subsp. *geographicum*) y otro con 4 individuos, el Clado B, de 3 subespecies morfológicas diferentes (*R. geographicum* subsp. *diabasicum*, *R. geographicum* subsp. *prospectans* y *R. geographicum* subsp. *frigidum*). El resto de individuos de la Clase 1 así como los de la Clase 4 se encuentran distribuidos por distintos clados y ramas del árbol filogenético. Ninguna de las dos clases más importantes presentes en el Linaje I comprende individuos de una única especie o subespecie morfológica clásica ni el conjunto de ellos forman clados monofiléticos respaldados que pudieran ser útiles para definir taxones independientes.

En el caso del Linaje II (Fig. 2.10.b) la Clase 2 forma 3 clados pequeños respaldados por las probabilidades de los análisis filogenéticos, Clado C, Clado D y Clado E, con tan sólo 2 individuos cada uno de ellos. Vemos como las especies y subespecies morfológicas clásicas se mezclan; en el Clado C se encuentran *R. lecanorinum* y *R. riparium* subsp. *lindsayanum*; el Clado D está formado por un individuo de *R. riparium* subsp. *lindsayanum* y otro de *R. tinei*; por último el Clado E contiene dos individuos uno de la especie *R. riparium* subsp. *lindsayanum* y *R. tavaresii*. Lo mismo ocurre en el caso de la Clase 3 que forma dos clados pequeños respaldados, el Clado F con 2 individuos, uno de *R. drepanodes* y otro de *R. tavaresii*, y el Clado G, con 3 individuos, dos de ellos de la especie *R. lecanorinum* y uno de *R. macrosporum*.

En resumen el análisis de *cluster* no apoya los linajes obtenidos del análisis molecular ya que las clases obtenidas del *Cluster* 4, elegido por tener los valores de p-valor más significativos con respecto al análisis de la χ^2 , no concuerdan con los linajes.

Por otro lado el análisis no agrupa a las especies y subespecies morfológicas definidas hasta ahora ya que estas no quedan agrupadas en clases atendiendo a los caracteres anatómicos y químicos con los que fueron descritas (Räsänen 1942a y b; 1943b; 1944; 1949b; Runemark 1956a; Thomson 1967; Feuerer 1970; Poelt 1988 etc.). Si hubiera sido así el análisis de *cluster* se habría detenido, o dado los valores de p-valor más significativos para la χ^2 , en el nivel de división de 14 clases, correspondientes a las distintas especies y subespecies estudiadas, o al menos en 10 clases si entendemos que las subespecies -por un lado *R. riparium* subsp. *riparium* y *R. riparium* subsp. *lindsayanum*, por otro *R. geographicum* subsp. *prospectans*, *R. geographicum* subsp. *frigidum* y *R. geographicum* subsp. *geographicum* y *R. tinei* y *R. geographicum* subsp. *diabasicum* (estas dos últimas sinónimos una de otra Poelt

1988)- tenderían a agruparse en clases comunes y no una por subespecie ya que las características morfológicas y químicas son más parecidas entre sí que con otras especies del grupo de *R. geographicum* (Räsänen 1942a y b; 1943b; 1944; 1949b; Runemark 1956a; Thomson 1967; Feuerer 1978; Poelt 1988).

Sin embargo en el caso del *Cluster 7* (con 7 clases distintas) proporciona los resultados menos fiables, aun teniendo los valores más significativos para el p-valor de la χ^2 (= 0.002): el propio análisis advierte de que el resultado es el menos íntegro y que el análisis de la χ^2 no es válido, puesto que en un 21% de las clases obtenidas hay menos de 5 individuos -Apéndice 2 apartado C. 1-.

Por lo que de este análisis se puede concluir que los caracteres morfológicos, anatómicos y químicos usados tradicionalmente no son lo suficientemente significativos ya que han sido usados además de manera poco consistente y por tanto se ha dado lugar a unos taxones cuyos límites nunca han estado bien definidos y no pueden ser utilizados en la diagnosis de los taxones,

-Análisis Discriminante: en general el análisis discriminante no apoya los linajes obtenidos por el análisis filogenético, sin embargo la clasificación no es del todo restrictiva ya que la probabilidad posterior seleccionada por el análisis para incluir un individuo en uno u otro grupo es muy baja y en muchos casos la diferencia de pp para pertenecer a uno u otro grupo es muy pequeña. Tal es el caso por ejemplo de los individuos del Linaje I *R. geographicum* subsp. *frigidum* MAF-16732 y *R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16638 que según el análisis discriminante deberían pertenecer al Linaje II ya que las probabilidades posteriores para pertenecer al Linaje II son 0,50 y 0,51 respectivamente. En el Linaje II encontramos ejemplos similares como *R. lecanorinum* MAF-16665 y *R. sublucidum* MAF- 16680 con pp de 0,53 y 0,56 respectivamente.

Si observamos lo que ocurre por clados monofiléticos pequeños, respaldados por las probabilidades del análisis filogenético, vemos que en el Linaje I sólo dos clados, el Clado 1 (*R. riparium* subsp. *lindsayanum* MAF-16638 con pp=0,51 y *R. sublucidum* MAF-16639 con pp=0,72) y el Clado 2 (*R. sublucidum* MAF-16707 con una pp=0,65, *R. lecanorinum* MAF-16731 cuya pp es igual a 0,75 y *R. sublucidum* MAF-16734 con pp=0,56), deberían pertenecer por completo al Linaje II.

Aunque si atendemos a criterios más restrictivos de interpretación de la probabilidad posterior, por ejemplo que fueran $pp \geq 0,75$, no podríamos clasificar ambos clados como pertenecientes al Linaje II. En el Linaje II sólo encontraríamos un clado que debería pertenecer por completo al Linaje I. Se trata del Clado 3 con 3 individuos; *R. tinei* MAF-16695 $pp=0,50$, *R. lecanorinum* MAF-16665 cuya probabilidad posterior es igual a 0,53 y *R. riparium* subsp. *lidsayanum* MAF-16690 con $pp=0,51$. Los 3 individuos tienen una probabilidad posterior muy baja de pertenecer al Linaje I, siguiendo el mismo criterio explicado antes no podríamos afirmar que este resultado es completamente fiable.

Además el análisis agrupa los 100 individuos estudiados en dos grupos diferentes en base a 4 caracteres morfológicos significativos; diámetro del apotecio, altura del apotecio, altura del himenio y longitud de las esporas. Si el análisis discriminante hubiera seguido un criterio más restrictivo a la hora de agrupar los individuos en uno u otro linaje, como por ejemplo con una $pp \geq 0,75$ en base a los caracteres morfológicos elegidos, solamente 3 individuos (un 8,3%) del Linaje I deberían encontrarse en el Linaje II (*R. lecanorinum* MAF-16731, *R. lecanorinum* MAF-16715 y *R. geographicum* subsp. *frigidum* MAF-16709) y 4 individuos del Linaje II (el 6,25% de los individuos) deberían pertenecer al Linaje I (*R. tinei* MAF-16654, *R. sphaerosporum* MAF-16664, *R. tavaresii* MAF-16679 y *R. geographicum* subsp. *frigidum* MAF-16646). Al tratarse de porcentajes muy bajos, menores del 10% para cada linaje, y entendiendo estos como errores mínimos en la toma de datos, se podría considerar en este caso que el análisis discriminante apoya a la división realizada por el análisis filogenético y utilizar estos cuatro caracteres como caracteres válidos para identificar cada linaje.

Dichos caracteres, como se ha apreciado en análisis estadísticos anteriores y en las observaciones realizadas durante la toma de datos, no son significativos ni ilustrativos en su totalidad: por un lado la altura del apotecio y la altura del himenio están fuertemente correlacionadas, con lo que bastaría el uso de uno de ellos. Al utilizar los dos como significativos probablemente el análisis este incurriendo en una redundancia. El diámetro del apotecio y la longitud de las esporas han dado valores significativos para todos los análisis estadísticos realizados, aunque existe solapamiento entre los valores medidos para ambos linajes; no podemos por tanto dar rangos exactos de valores para cada carácter, que sirvieran para identificar uno u otro linaje, por lo que no se pueden considerar y se desaconseja su utilización como caracteres estrictamente descriptivos para ninguno de los dos linajes.

Al definir dos linajes evolutivos distintos dentro del grupo de *R. geographicum*, (Linaje I y el Linaje II) y utilizar el concepto unificado de especie (De Queiroz 2007) para intentar delimitar el número de especies y subespecies reales que podrían aparecer, respondiendo estas a una serie de propiedades y dado los resultados obtenidos de todos los análisis realizados, filogenéticos, morfológicos-químicos y estadísticos combinando filogenia y morfología, se descartan la posibilidad de reconocimiento de las 14 especies y subespecies morfológicas tradicionales estudiadas.

La posibilidad de que cada linaje fuera una especie distinta ha quedado descartada también por cumplir únicamente con la propiedad filogenética (monofilia). Las propiedades ecológica-geográficas, fenotípicas y evolutivas no son exclusivas de cada linaje sino que ambos las comparten, por lo que no podemos afirmar que los linajes corresponderían a 2 especies diferentes.

La perspectiva de que *Rhizocarpon geographicum* s. lat. fuera considerado como una única especie, parece la más convincente. Esta opción mantiene la propiedad filogenética ya que el grupo es monofilético, y el resto de propiedades (fenotípica, ecológica-geográfica) también respaldarían esa alternativa. Se propone por tanto la sinonimia de los nombres de las 14 unidades taxonómicas estudiadas en el 'binomen' *Rhizocarpon geographicum*, con dos linajes evolutivos diferentes y una gran variabilidad fenotípica, a falta de comprobar este hecho a nivel de la distribución mundial del grupo y confirmar que el patrón se mantiene - Capítulo 5 y Discusión general-.

CONCLUSIONES.

Después de haber estudiado la filogenia y caracterización fenotípica (en cuanto a caracteres morfológicos y químicos) de 14 especies (de las 26 de las reconocidas) del llamado grupo de *Rhizocarpon geographicum*, se ha llegado a la siguiente conclusión principal:

Todas las especies estudiadas son polifiléticas no observándose patrón evolutivo alguno. Considerando estas especies, el grupo de *Rhizocarpon geographicum* formaría un clado monofilético que correspondería a una única especie de acuerdo al concepto unificado de especie (De Queiroz 2007). Se propone la sinonimia de estas 14 especies reconociendo únicamente el ‘binomen’ *Rhizocarpon geographicum*. La especie así considerada comprendería individuos que comparten caracteres morfológicos importantes como el tipo de ascósporas y ascocarpos, y caracteres vegetativos y químicos notablemente variables. La especie mostraría también una relativa homogeneidad en cuanto a la ecología y una distribución geográfica muy amplia, posiblemente bipolar.

En las muestras estudiadas se han apreciado dos linajes evolutivos, que deben ser más profundamente estudiados, particularmente ampliando el muestreo geográfico y atendiendo a las variables micro-ecológicas.

Otras conclusiones del trabajo son las siguientes:

- 1) Queda patente que el valor taxonómico de los caracteres anatómicos y químicos en el caso del grupo es bajo debido muy probablemente a la fuerte homoplasia de dichos caracteres y a su aparición varias veces en la evolución de los individuos del grupo, como ya apuntaban Ihlen y Ekman (2002) en trabajos anteriores, lo que hace suponer que el requerimiento de dichos caracteres está atendiendo a estrategias vitales de adaptación.

- 2) El subgénero *Rhizocarpon* podría ser polifilético. Tanto el género como el subgénero precisarían de una revisión en profundidad. Nuestros resultados muestran que individuos del grupo *Superficiale*, incluidos hasta ahora en el subgénero *Rhizocarpon*, de acuerdo con el concepto actual del género (Thomson 1967; Hafellner 1984) en el que el subgénero *Rhizocarpon* aglutina a las especies amarillas del género, se encontrarían más emparentados con individuos del subgénero *Phaeothallus* (especies marrones y grises) a falta de incluir muestras de dicho subgénero que corroboren esta hipótesis.

- 3) El subgénero *Rhizocarpon* contendría 3 clados monofiléticos, los llamados tradicionalmente grupo *Alpicola*, grupo *Viridiatrum* y grupo de *R. geographicum*, y un cuarto grupo por definir que incluiría especies y subespecies del hasta ahora grupo *Superficiale*, pero no todas las incluidas hasta el momento.

CAPÍTULO 3: Estudio de la variabilidad intra-específica de la región de copia múltiple ITS nu y valor informativo de los genes de copia única en el grupo de *Rhizocarpon geographicum*

CHAPTER 3: Study of the intra-specific variability of nuITS region and Single-copy genes value in the *Rhizocarpon geographicum* group.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Phylogenetic results from Chapter 2 -Fig. 2.4 y 2.5- have been discordant with the taxonomy accepted in the group. In case of taxonomy was correct, some possibilities to explain this result are possible: intra-specific variability of the primers used, or minor errors in techniques used (in PCR amplification or in sequencing reaction). We check here these possibilities by two experiments: cloning and extracting DNA from different parts of the same thallus (re-extraction and re-sequences) from some samples for nuITS.

Many studies in lichens phylogeny compare more than two genes to support the phylogeny obtained. Single-copy genes are common and useful tools for this. We check here the information provided from RNA polymerase II –RPB1- region in more than 50% of the specimens from the Iberian Peninsula, and compare it with the information obtained from nuITS and mtLSU.

MATERIAL AND METHODS

We analysed a 10% of individuals from the Iberian Peninsula (Chapter 2), selected randomly among each of the major “morpho-species” studied. DNA extraction from different parts of the same thallus using nuITS regions was done for each of the selected individuals -Table 3.1-. DNA extraction, amplification and alignment were described in General Methods.

Two representative and abundant “morpho-species” of the group were chosen for cloning of the nuITS: *R. lecanorinum* and *R. tinei*. We took one individual from each lineages detected in Chapter 2 -Table 3.3-. nuITS amplification conditions for cloning were detailed in the Table 3.4. We used the purification products for cloning by *Escherichia coli* vector, following the manufacture specifications. We chose 24 colonies for each individual and we amplified a total of 96 clones by PCR with ITS-1F and LR1 primers under amplification conditions described in Table 3.4.

Single-copy gen RPB1 was sequenced for 53 individuals -Table 3.6- under the PCR conditions detailed in the Table 3.5. Alignment specification was described in General Methods. Phylogenetic inference was performed using maximum parsimony -bootstrap $\geq 70\%$ - analysis and bayesian inference (MC)³ -pp ≥ 0.95 -. We have compared the RPB1-nuITS-mtLSU phylogenetic tree with the nuITS-mtLSU tree.

All the sequencing was carried out in the Sequencing Center of the Naturmuseum Senckenberg (Frankfurt am Main).

RESULTS AND DISCUSSION

The most relevant phylogenetic marker was nuITS (Chapters 2 and 5). Therefore, we tried to confirm the value of this region in our specimens and to discard failures in amplification or sequences reactions.

New data sets from nuITS were obtained from cloning and new DNA extractions -Table 3.7 and 3.8-. The new sequences generated for same samples and between the clones are very similar each other. We didn't detect a high number of polymorphisms enough to support the hypothesis of the existence of more than two different genotypes in the same thallus or nuITS has a high intra-specific variability.

We obtained only a 69.8% of effectives in RPB1 sequencing. The phylogenetic trees comparison in Figure 3.4 shows that the single-copy gene RPB1 combined with nuITS and mtLSU doesn't provide more support or resolution -Fig. 3.4 Tree A- than the combined nuITS and mtLSU data set -Fig. 3.4 Tree B-.

We confirmed the efficiency of nuITS in our phylogenetic analysis, discarded failures in PCR and sequencing reactions. The region RPB1 didn't provide additional information on the phylogeny of the group.

INTRODUCCIÓN

Los resultados obtenidos en el capítulo filogenético de nuestro trabajo sobre el grupo de *Rhizocarpon geographicum* (Capítulo 2) resultan ser discordantes en relación con la taxonomía vigente del grupo -Fig. 2.4 y 2.5, Capítulo 2-. Ante la posibilidad de que algún problema en relación con las técnicas del tratamiento experimental de los marcadores hubiera podido afectar al análisis filogenético se consideró adecuado efectuar chequeos complementarios en relación con las técnicas genómicas usadas.

A menudo la identificación de los individuos del grupo de *R. geographicum* a nivel específico y sub-específico se vuelve complicada al encontrar en un mismo talo caracteres divergentes, e.g. la aparición de apotecios angulares y circulares o esporas de un mismo apotecio con número variable de células, debido a que estos caracteres son extremadamente plásticos. Este hecho puede ser debido a numerosas razones como la aparición de polimorfismos genéticos que han provocado diferencias fenotípicas o a una fertilización cruzada por heterotalismo (Murtagh *et al.* 2000; Honegger *et al.* 2004). La gran mayoría de los estudios realizados sobre heterotalismo en líquenes se basan en la utilización de cultivos estériles de ascósporas aisladas y su posterior secuenciación utilizando técnicas de RAPD-PCR y AFLP-PCR (Zoller *et al.* 1999; Murtagh *et al.* 2000; Honegger *et al.* 2004; Seymour *et al.* 2005; Honegger y Zippler 2007; Singh *et al.* 2012). Debido a las lentas tasas de crecimiento de los talos de *Rhizocarpon geographicum* s. lat. (Halle 1983; Armstrong 1983; Innes 1985; Sancho *et al.* 2007a), combinado con la problemática de hacer crecer estos líquenes bajo condiciones controladas durante largos periodos en el laboratorio (Armstrong 2011), se ha optado por otro procedimiento más eficiente.

En primer lugar, se ha realizado la extracción de ADN de otras partes del talo de algunos individuos para la re-amplificación de la región ITS nu, que nos servirá para descartar posibles errores o contaminaciones en la extracción y secuenciación del ADN de los individuos estudiados así como comprobar su variabilidad “intra-específica”.

Por otro lado, el ADNr comprende a menudo genes que se pueden repetir centenares o miles de veces que suelen ser secuencias generalmente cortas no codificantes. Es probablemente el tipo de ADN más útil para los estudios sobre evolución debido a que las múltiples copias organizadas en tándem facilitan los análisis de hibridación, además la longitud de la unidad repetitiva se encuentra dentro de un rango que permite el análisis de los fragmentos de restricción (Menéndez *et al.* 1997).

Las repeticiones en tándem son un elemento abundante en los genomas (Britten y Kohne 1968). Estas repeticiones evolucionarían conjuntamente dentro de un genoma y serían más similares entre sí que las repeticiones de “ortólogos” en especies cercanas, definiendo este hecho como “evolución concertada” (Zimmer *et al.* 1980). Las repeticiones de ADNr y concretamente los dos espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) han sido ampliamente estudiados como genes repetitivos donde las repeticiones en tándem están organizadas en uno o más sitios en el genoma (Dawid 1980; Gandel y Kobayashi 2007).

Los segmentos transcritos internos no codificantes (ITS nu) del ADNr difieren mucho en secuencia y en organización de una especie a otra, aunque siempre se caracterizan por ser ricos en guaninas-citosinas. La única característica en común de las secuencias de ITS entre distintas especies es la presencia de repeticiones directas organizadas en tándem, siendo la secuencia de la unidad de repetición propia de cada organismo (Menéndez y González 1997). La gran variabilidad del segmento de ITS nu del ADNr hacen de esta región una de las más usadas para la delimitación específica en líquenes (Crespo y Cubero 1998; Blanco *et al.* 2004; Divakar *et al.* 2005; Muggia *et al.* 2008; Vondrák *et al.* 2009; Crespo *et al.* 2010a; Pérez-Ortega *et al.* 2012), así como en la investigación en *barcoding* no sólo para líquenes sino también en el estudio de hongos no liquenizados (Schoch *et al.* 2012).

El análisis por clonación de esta región (Linder y Banik 2011) podría facilitar la identificación de repeticiones organizadas en tándem, la identificación de copias distintas dentro del tándem, así como la posibilidad de encontrar varios genotipos (variabilidad intra-específica) en los talos de *Rhizocarpon geographicum* s. lat. como una de las posibles explicaciones genotípicas ante la homoplasia de los caracteres fenotípicos, la polifilia de las “morfo-especies”² del grupo así como la topología de los árboles filogenéticos observados en el Capítulo 2. Se utilizó por tanto la clonación de ADN por técnicas acelulares (PCR) ya que se trata de una forma efectiva de obtener un gran número de copias del segmento ITS nu en poco tiempo, aunque con este experimento no podríamos detectar copias distintas por heterotalismo en todo el cistrón ribosomal.

² Se está denominando “morfo-especie” a las especies reconocidas como tal cuyas relaciones filogenéticas son desconocidas o cuando éstas no respaldan el concepto filogenético de especie.

Es común en los estudios filogenéticos en líquenes el uso de varios marcadores que aporten mayor consistencia y resolución a estos análisis (Crespo *et al.* 2001; Blanco *et al.* 2004; Thell *et al.* 2009; Crespo *et al.* 2010a y b; Divakar *et al.* 2010; Fernández-Mendoza *et al.* 2011). La secuenciación de genes de copia única proporciona una opción adecuada para la reconstrucción de filogenias a niveles específicos como por ejemplo RPB2 (Reeb *et al.* 2004; Tehler e Irestedt 2007; Hofstetter *et al.* 2007; Otálora *et al.* 2010; Pino-Bodas *et al.* 2011) o Mcm7 (Schmitt *et al.* 2009; Leavitt *et al.* 2011 a y b; Spribille *et al.* 2011).

Tras diversas pruebas comprobando la eficiencia en la amplificación y secuenciación de diversos genes de copia única (EF- α , Mcm7 o RPB2) en los individuos de *Rhizocarpon geographicum* s. lat., nos inclinamos por la utilización de la subunidad grande de la ARN polimerasa II -RPB1- (Matheny *et al.* 2002), por tratarse de un gen codificante para proteínas de copia única y que presenta una alta eficacia en análisis filogenéticos en otros grupos de líquenes (Crespo *et al.* 2007, 2010b; Hofstetter *et al.* 2007; Ekman *et al.* 2008; Lücking *et al.* 2008; O'Brien *et al.* 2009; Wedin *et al.* 2011). Así, se usó el gen RPB1 como complementario a las regiones del ITS nu y del LSU mt, con los que se compararán los resultados filogenéticos obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio de la variabilidad intra-específica de la región de copia múltiple ITS nu

De los 100 individuos del grupo de *R. geographicum* incluidos en el Capítulo 2, se tomó un 10% de individuos, efectuando una selección aleatoria e intentando abarcar la mayor diversidad en “morfo-especies” del grupo estudiadas. Así, se tomaron 10 individuos distintos de los linajes detectados en el Capítulo 2 -Fig. 2.2-, identificados como 8 “morfo-especies” distintas del grupo de *R. geographicum* (Tabla 3.1), procedentes de 4 localidades principales (se recomienda revisar Tabla 2.1 del Capítulo 2 para las especificaciones de las localidades):

Tabla 3.1.- Re-Amplificación de la región ITS nu: “morfo-especies” analizadas.

“Morfo-especies”	Cód. Herbario	Localidad
<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	MAF-16692	L
<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	MAF-16646	N
	MAF-16666	G
<i>R. lecanorinum</i>	MAF-16670	G
<i>R. macrosporum</i>	MAF-16699	L
<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	MAF-16650	N
<i>R. sphaerosporum</i>	MAF-16643	N
<i>R. sublucidum</i>	MAF-16639	N
<i>R. tinei</i>	MAF-16649	N
	MAF-16687	SN

El protocolo de extracción de ADN es el mismo explicado en la Metodología General, con la excepción de que se tomaron areolas limpias de impurezas alejadas de la parte del talo donde se tomaron para la primera extracción de ADN. Los *primers* utilizados en la re-amplificación fueron ITS 1F (Gardes y Bruns 1993) y LR1 (Vilgalys y Hester 1990), las condiciones para la PCR son las especificadas en la Tabla 3 de la Metodología General. La purificación del ADN se realizó tanto con el kit comercial BigDye© Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) como con el GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter) bajo las condiciones indicadas en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2.- Condiciones de Purificación.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
94 °C	30 min.	1
95 °C	15 min.	29
45 °C	15 min.	1
60 °C	4 min.	1

La secuenciación se llevó a cabo en el Centro de Secuenciación del Naturmuseum Senckenberg de Frankfurt am Main, donde se utilizó el secuenciador automático ABI PRISM®-3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) o el secuenciador CEQ™ 8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter), usando los mismos *primers* para la secuenciación. Las secuencias producidas en dirección tanto 5'→3' como 3'→5' fueron revisadas, ensambladas y comparadas en el programa Geneious Pro v. 5.3.6 (Drummond *et al.* 2010) con las secuencias del par de *primers* internos ITS 1LM (Myllys *et al.* 1999) e ITS 2KL (Lohtander *et al.* 1998), y en el caso de *R. lecanorinum* MAF-16670 con la secuencia de ITS 1F, todas ellas obtenidas previamente en el Capítulo 2.

Clonación de la región ITS nu

Para la clonación del segmento de ITS nu se eligieron las extracciones de 2 “morfo-especies” muy abundantes y representativas del grupo de *R. geographicum*: *R. lecanorinum* y *R. tinei* (Tabla 3.3). De cada linaje se tomó un individuo de cada “morfo-especie” atendiendo a la cantidad de extracto de ADN disponible y a la eficiencia de la reacción de amplificación observada en el Capítulo 2.

Se secuenciaron por tanto para la clonación 4 individuos en total del grupo -Tabla 3.3- de los que se esperaba obtener 24 clones de cada uno de ellos y poder comprobar la posible aparición de segmentos en tándem, la observación de posibles híbridos o si la región ITS nu puede encontrarse en diferentes copias o duplicada en un mismo individuo.

Tabla 3.3.- Clonación de la región ITS nu: “morfo-especies” analizadas.

“Morfo-especies”	Cód. Herbario	Localidad	Linaje
<i>R. lecanorinum</i>	MAF-16715	Hu	I
	MAF-16705	SE	II
<i>R. tinei</i>	MAF-16687	SN	I
	MAF-16649	N	II

Se procedió en primer lugar a realizar una amplificación del segmento ITS 1F-LR1 utilizando el kit comercial Illustra™ PuReTaq™ Ready-to-Go™ PCR Beads (GE Healthcare), según los volúmenes indicados en la Metodología General y bajo las condiciones de PCR detalladas en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4.- Condiciones de PCR para el segmento ITS nu (1F-LR1).

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos-segundos)	Ciclos
94 °C	5 min.	1
94 °C	30 seg.	
54 °C	30 seg.	5
72 °C	1 min.	
94 °C	30 seg.	
48 °C	30 seg.	33
72 °C	1 min.	
72 °C	10 min.	1

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis según las condiciones indicadas en la Metodología General. Se cortaron las bandas para los amplificados de cada muestra y se procedió a su purificación utilizando el kit comercial de purificación QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los purificados de cada muestra fueron utilizados para la clonación que se realizó con el vector pGEM®-T Easy Vector System-Kit (Promega) y las células JM-109 de *Escherichia coli* (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. De las colonias resultantes de la clonación se eligieron las 24 mejores para cada individuo de cada una de las “morfo-especies” analizadas (Fig. 3.1). Se volvió a realizar una PCR para la amplificación de la región ITS 1F-LR1 de los 96 clones, según las condiciones especificadas anteriormente.



Figura 3.1.- Cultivo de colonias de *E. coli* para la clonación del segmento de ITS nu de una de las muestras utilizadas de *R. geographicum* s. lat. En la placa se han marcado con una “X” y una letra del alfabeto las 24 colonias (clones) elegidas para el análisis.

Se comprobó el producto de amplificación de PCR nuevamente por gel de agarosa al 1% y se purificaron los productos de la amplificación con el kit comercial NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel). La secuenciación se llevó a cabo en el Centro de Secuenciación del Naturmuseum Senckenberg de Frankfurt am Main, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las secuencias producidas fueron revisadas, ensambladas y comparadas en el programa Geneious Pro v. 5.3.6 (Drummond *et al.* 2010).

Viabilidad en la utilización de genes de copia única: RPB1

Se ha secuenciado la subunidad grande de la RNA polimerasa II -RPB1- (Matheny *et al.* 2002) específico para hongos (Fig. 3.2) de 53 individuos de *R. geographicum* s. lat. de la Península Ibérica -19 pertenecientes al Linaje I y 34 al Linaje II- de las 14 “morfo-especies” estudiadas en el Capítulo 2.

Se incluyeron más individuos de algunas “morfo-especies” por ser más comunes y se abarcó las 7 localidades principales muestreadas de las que se han tomado un mínimo de 5 individuos por localidad y completando con individuos de 3 localidades secundarias. En total se estudiaron un 53% de individuos analizados en el Capítulo 2, más 1 individuo del grupo *Superficialis*, con el fin de establecer correctamente las relaciones filogenéticas con el grupo de *R. geographicum* -Tabla 3.6-, (para especificaciones de las localidades y recolector se recomienda revisar la Tabla 2.1 y 2.2 del Capítulo 2).

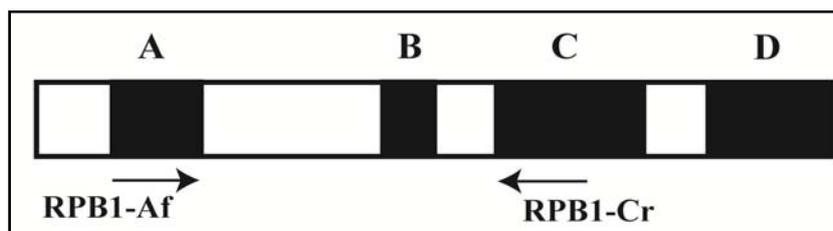


Figura 3.2.- Posición relativa de los cebadores utilizados para la región de la subunidad grande de la RNA polimerasa II, RPB1. Los cuadrados en negrita señalan las zonas de aminoácidos conservados. (Fuente: www.lutzonilab.net)

La amplificación del segmento de RPB1 se realizó utilizando los *primers* de la Fig. 3.2 -Af (Stiller y Hall 1997) Cr (Matheny *et al.* 2002) y usando el kit comercial Illustra™ PuReTaq™ Ready-to-Go™ PCR Beads (GE Healthcare), según los volúmenes indicados en la Metodología General y bajo las condiciones de PCR especificadas en la tabla 3.5.

Tabla 3.5.- Condiciones de PCR para el locus RPB1 (Af-Cr).		
Temperatura (°C)	Tiempo (minutos-segundos)	Ciclos
95 °C	5 min.	1
95 °C	1 min.	
58 °C Decreciendo 1 °C por ciclo	1 min.	8
72 °C	1 min 45seg.	
95°C	1 min.	
50 °C	1 min..	34
72 °C	1 min 45seg.	
72 °C	10 min.	1

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis según las condiciones indicadas en la Metodología General. La purificación se realizó con el kit comercial de Enzimas Illustra ExoSAP-IT™ PCR Clean Up (GE Healthcare) según las condiciones indicadas en la Metodología General. La secuenciación se llevó a cabo en el Centro de Secuenciación del Naturmuseum Senckenberg de Frankfurt am Main, donde se utilizaron los secuenciadores automáticos descritos anteriormente y los *primers* indicados.

Las secuencias producidas fueron revisadas, ensambladas y comparadas en el programa Geneious Pro v. 5.3.6 (Drummond *et al.* 2010). Las regiones ambiguas fueron eliminadas del alineamiento como se ha indicado en la Metodología general.

El análisis bayesiano (MC)³ para la obtención del árbol filogenético se realizó asumiendo el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica GTR+ I+ G (*General Time Reversible*) (Rodríguez *et al.* 1990), teniendo en cuenta la distribución de cambios entre las bases nitrogenadas. Se utilizó una matriz combinada de los tres genes estudiados: RPB1, ITS nu y LSU mt. Se tuvo en cuenta la partición de cada una de las regiones como independientes unas de otras, se corrió un total de 4 *runs* paralelos, 4 millones de generaciones y 8 cadenas. Cada 100 árboles muestreados, un árbol fue salvado en un archivo generado por el programa, eliminando los 2.000 primeros árboles como *burn-in*. La compatibilidad entre los genes utilizados y por tanto la congruencia entre los árboles obtenidos para los 3 genes se realizó comparando los clados de los árboles filogenéticos con elevada pp (≥ 0.95) obtenidos del análisis bayesiano para cada gen por separado.

Se generó además un árbol filogenético por análisis bayesiano (MC)³ con la matriz combinada de los genes ITS nu y LSU mt para su comparación con el árbol filogenético obtenido para los tres genes y ver así la efectividad del uso del gen RPB1 en el grupo de *R. geographicum*. Las condiciones para el análisis bayesiano así como el modelo evolutivo elegido fueron los mismos que se detallan más arriba para el análisis de la matriz de las 3 regiones.

El análisis de MP para ambos árboles filogenéticos se llevó a cabo siguiendo las especificaciones detalladas en la sección correspondiente de la Metodología General (*bootstrap* $\geq 70\%$).

Como *outgroup* se utilizaron nuevamente las secuencias de *Cetraria aculeata*, junto con 1 taxón de *Parmelina tiliacea* para ambos arboles como se indicaba en la Metodología General. Para *Parmelina tiliacea* no se obtuvo amplificación para la región RPB1, la secuencia de RPB1 de *Cetraria aculeata* fue cedida por F. Fernández-Mendoza.

Tabla 3.6.- “Morfo-especies” analizadas para la región de la subunidad grande de la RNA polimerasa II (RPB1). En gris se indican las especies de otros grupos del subgen. *Rhizocarpon* incluidas. -/- Indica las secuencias de RPB1 de baja calidad no incluidas en los análisis.

“Morfo-especies”	Cód. Herbario [Localidad]	LINAJE
<i>R. drepanodes</i>	MAF-16651 [Ba]	II
<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	MAF-16730 [SF]	I
	MAF-16733 [SF]	I
<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	MAF-16646 [N] -/-	II
	MAF-16732 [SF]	I
	MAF-16677 [SN]	I
<i>R. geographicum</i> ssp. <i>geographicum</i>	MAF-16718 [Pi]	I
	MAF-16719 [Pi] -/-	I
<i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i>	MAF-16692 [L] -/-	II
	MAF-16726 [Pi]	I
<i>R. lecanorinum</i>	MAF-16670 [G]	II
	MAF-16715 [Hu]	I
	MAF-16705 [SE] -/-	II
	MAF-16731 [SF]	I
<i>R. macrosporum</i>	MAF-16716 [Hu]	II
	MAF-16699 [L]	II
	MAF-16723 [Pi] -/-	II
	MAF-16711 [SE]	II
	MAF-16737 [SF]	I
	MAF-16740 [SF]	II
	MAF-16678 [SN]	II
<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	MAF-16667 [G] -/-	II
	MAF-16638 [N]	I
	MAF-16647 [N] -/-	II
	MAF-16725 [Pi]	II
	MAF-16712 [SE]	II
	MAF-16713 [SE]	II
<i>R. riparium</i> subsp. <i>riparium</i>	MAF-16694 [L]] -/-	II
	MAF-16636 [N]]] -/-	II
<i>R. saanaëense</i>	MAF-16714 [Hu]	II
<i>R. sphaerosporum</i>	MAF-16664 [G] -/-	II
	MAF-16643 [N] -/-	II
	MAF-16645 [N] -/-	II
	MAF-16720 [Pi]	II
<i>R. sublucidum</i>	MAF-16655 [G]	I
	MAF-16669 [G]	I
	MAF-16639 [N]	I
	MAF-16707 [SE]	I
	MAF-16680 [SN] -/-	II
	MAF-16688 [SN]	I
<i>R. tavaresii</i>	MAF-16653 [CR]	II
	MAF-16658 [G]	II
	MAF-16704 [SE] -/-	II
	MAF-16735 [SF]	II
	MAF-16686 [SN]	II
<i>R. tinei</i>	MAF-16654 [G] -/-	II
	MAF-16693 [L]	II
	MAF-16695 [L]	II
	MAF-16697 [L]	II
	MAF-16642 [N] -/-	I
	MAF-16649 [N]	II
	MAF-16706 [SE]	I
	MAF-16687 [SN]	I
Grupo <i>Superficial</i> :	MAF-16736 [SF]	
<i>R. superficiale</i> subsp. <i>superficiale</i>		

RESULTADOS

Estudio de la variabilidad intra-específica de la región de copia múltiple ITS nu

Se obtuvieron 10 nuevas secuencias de la región ITS nu, resultando el experimento de re-amplificación 100% efectivo. Las nuevas secuencias obtenidas fueron comparadas con las 10 primeras secuencias de ITS nu de cada individuo resultantes de la primera amplificación y secuenciación de esta región. Por encima del 99% de sitios idénticos, se consideró que la re-amplificación de la región fue efectiva y las secuencias obtenidas idénticas. La Tabla 3.7 muestra los resultados de la comparación por pares de secuencias de cada individuo estudiado, en la Figura 3.3 vemos los gráficos de aquellas secuencias en las que han aparecido cambios en alguna de sus bases.

Tabla 3.7.- Variabilidad intra-específica de la región ITS nu: resultados de la comparación de secuencias para cada individuo estudiado.			
“Morfo-especie” Individuo	Long. Secuencia	Sitios Idénticos	N° de Cambios detectados/ Posición del cambio de base (sec. antigua-sec. nueva)
<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i> MAF-16692	502 pb	502 (100%)	---
<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i> MAF-16646	464 pb	464 (100%)	---
MAF-16666	499 pb	499 (100%)	---
<i>R. lecanorinum</i> MAF-16670	450 pb	450 (100%)	---
<i>R. macrosporum</i> MAF-16699	505 pb	505 (100%)	---
<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i> MAF-16650	510 pb	510 (100%)	---
<i>R. sphaerosporum</i> MAF-16645	476 pb	475 (99,8%)	1 base/ posición 47 (T-C)
<i>R. sublucidum</i> MAF-16639	409 pb	409 (100%)	---
<i>R. tinei</i> MAF-16649	493 pb	492 (99,8%)	1 base/ posición 302 (T-C)
MAF-16687	498 pb	497 (99,8%)	1 base/ posición 467 (T-C)

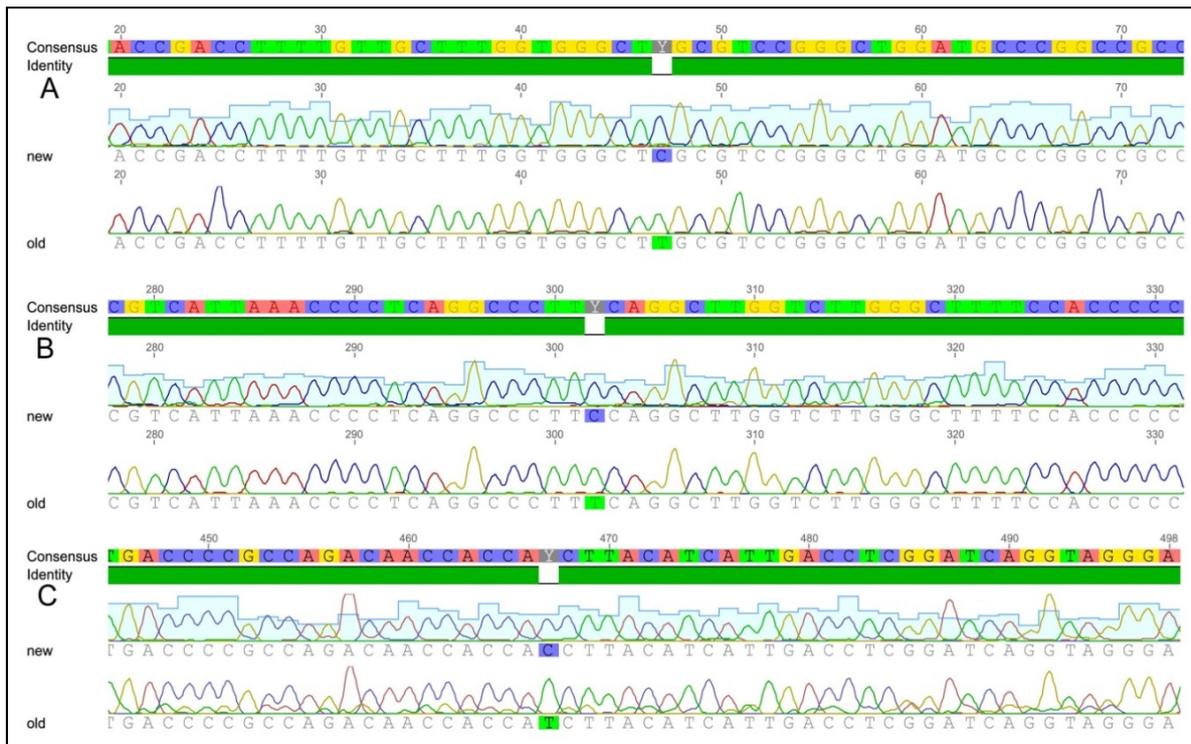


Figura 3.3.- Gráficos de las secuencias de las muestras estudiadas en la variabilidad intra-específica de la región ITS nu con cambios en alguna de sus bases nitrogenadas. Secuencia A: *R. sphaerosporum* MAF-16645. Secuencia B: *R. tinei* MAF-16649. Secuencia C: *R. tinei* MAF-16687. Se muestra como *new* la secuencia nueva obtenida del experimento de Re-secuenciación y como *old* la secuencia antigua para cada muestra. (Gráfico obtenido con el programa Geneious Pro v. 5.3.6).

Clonación de la región ITS nu

En total se obtuvieron 24 clones por cada individuo analizado con los que se produjo una librería de 88 secuencias nuevas de los 96 clones resultantes, obteniendo un 91,6% de efectividad. La Tabla 3.8 muestra los resultados de la comparación de las secuencias de los 24 clones analizados para cada individuo.

Por encima de un 95% de sitios idénticos se consideraron los clones como idénticos, los cambios puntuales en menos de un 5% de las bases nitrogenadas podrían deberse a errores en la secuenciación, ninguno de los clones obtenidos bajo de un 97% de sitios idénticos.

Tabla 3.8.- Clonación de la región ITS nu: resultados de la comparación de las secuencias obtenidas para los 24 clones analizados de cada individuo.

“Morfo-especie” Individuo	Clones Efectivos (de 24)	Long. Sec. Clones / Sitios Idénticos	Clones con Cambios / N° de cambios	Repeticiones en Tándem Detectadas
<i>R. lecanorinum</i>				
MAF-16705	21	518 pb / 509 (98,3%)	10 / 12	---
MAF-16715	22	523 pb / 518 (99,0%)	5 / 5	---
<i>R. tinei</i>				
MAF-16649	21	518 pb / 510 (98,5%)	7 / 8	---
MAF-16687	24	520 pb / 509 (97,9%)	9 / 11	---

Viabilidad en la utilización de genes de copia única: RPB1

Se obtuvieron un total de 37 secuencias parciales nuevas del marcador RPB1, obteniendo una efectividad en la secuenciación del marcador del 69,8 %, por lo que se recomendaría el diseño de *primers* específicos para la amplificación y secuenciación de la región de la subunidad grande de la RNA polimerasa II si se quiere usar en el grupo de *R. geographicum*.

Se obtuvo un árbol consenso 50% *Majority Rule* a partir de 158000 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ -Fig. 3.4 Árbol A- del grupo de *R. geographicum* que se generó a partir de tres matrices independientes para cada una de las regiones analizadas: una matriz de 608 caracteres de los cuales 228 son informativos para la región del RPB1, otra matriz de 498 caracteres de los cuales 252 son informativos para la región ITS nu, y una matriz de 388 caracteres de los cuales 118 son informativos para la región LSU mt. Se obtuvo una matriz general de 1486 caracteres de los cuales 598 eran informativos.

Se generó un segundo árbol consenso 50% *Majority Rule* a partir de 158000 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ -Fig. 3.4 árbol B- del grupo de *R. geographicum* utilizando únicamente las dos matrices independientes de la región del ITS nu y del LSU mt, obteniéndose una matriz general de 886 caracteres de los cuales 382 eran informativos.

Para los valores de los parámetros de probabilidad de ambos árboles filogenéticos se recomienda revisar el Apéndice 3 apartado A.

El análisis de MP para el árbol A (de las regiones RPB1, ITS nu y LSU mt) consideró 810 caracteres constantes, 294 como caracteres parsimónicamente informativos y 390 caracteres variables fueron parsimónicamente no informativos. Para el árbol B (de las regiones ITS nu y LSU mt) 206 caracteres constantes, 195 como caracteres parsimónicamente informativos y 485 caracteres variables fueron parsimónicamente no informativos.

En ambos árboles filogenéticos obtenidos (A y B), tanto el género *Rhizocarpon* como el grupo de *R. geographicum* aparecen formando clados respaldados por un elevado *bootstrap*. *Rhizocarpon superficiale* ssp *superficiale* aparece como grupo hermano del grupo de *R. geographicum*. Sin embargo no quedan bien definidas las relaciones filogenéticas a nivel de subgénero ya que no se han incluido individuos del género *Phaeothallus* ni de otros grupos del subgénero *Rhizocarpon*.

Se ha marcado en verde -Fig. 3.4 árbol B- los individuos que aparecieron dentro del Linaje I (17 individuos) y en rojo los individuos pertenecientes al Linaje II (20 individuos) definidos en el Capítulo 2. En ambos árboles no aparecen bien definidos sendos linajes debido muy probablemente al bajo número de individuos incluidos en los análisis, aun así se han marcado con el código de colores dado en el capítulo anterior para comparar la posición y consistencia de los clados con elevada pp y *bootstrap* del Árbol A con los del Árbol B.

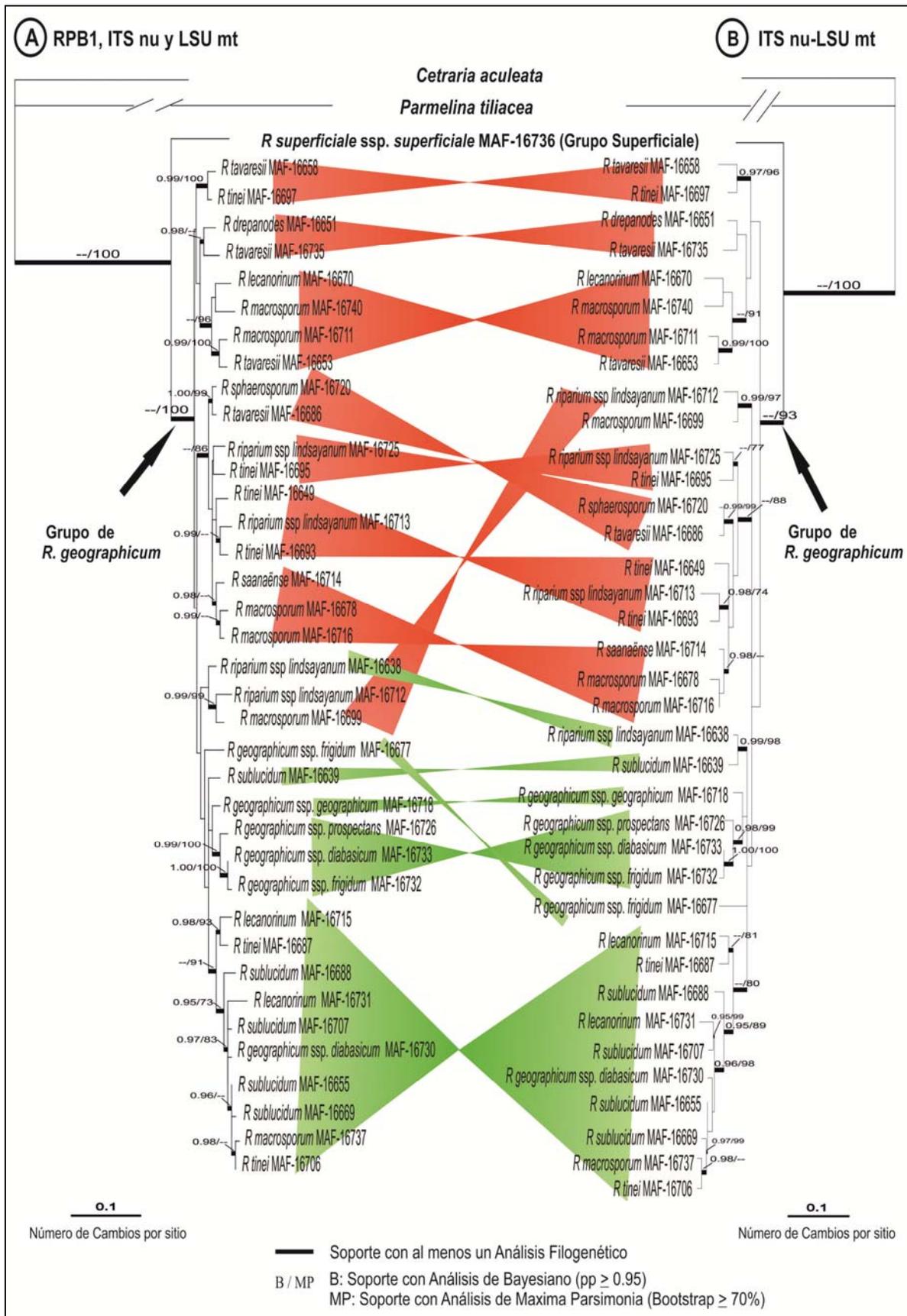


Figura 3.4.- Comparativa de los árboles filogenético del grupo de *R. geographicum*: Árbol A -RPB1, ITS nu y LSU mt- y Árbol B -ITS nu y LSU mt-. Árboles consenso 50 % *Majority Rule* obtenidos a partir de 158000 árboles. En verde se señalan los individuos pertenecientes al Linaje I y en rojo los pertenecientes al Linaje II tal y como se definieron en el Capítulo 2.

DISCUSIÓN

Estudio de la variabilidad intra-específica de la región de copia múltiple ITS nu

El 70% de las secuencias nuevas obtenidas del experimento de re-amplificación del ITS nu eran 100% idénticas a las secuencias producidas en la secuenciación inicial. Tan sólo el 30% de los individuos estudiados, tres individuos de dos “morfo-especies” diferentes -*R. sphaerosporum* MAF-16645 y *R. tinei* MAF-16649 y MAF-16687-, mostraron un cambio en una única posición en las tres secuencias nuevas generadas: una timina por una citosina en los tres casos, es decir una transición al tratarse de un cambio de base de una pirimidina por otra - Fig. 3.3-.

Podría tratarse de una mutación puntual que afecta únicamente a un nucleótido (SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)). Sin embargo, dado a que un 30% de las muestras presentaron cambios puntuales de un nucleótido es más probable que esta sustitución se deba a artefactos provocados por la enzima polimerasa en la reacción de amplificación (Cadwell y Joyce 1994) o en quizás en la reacción de secuenciación (Blanco 2004). Aunque una sustitución en un nucleótido, que supone en nuestro caso errores menores de 0.2%, no va a cambiar el resultado del análisis filogenético.

La clonación de la región ITS nu resultó 100% efectiva en lo que se refiere a la obtención de los clones y un 91,6% efectivo en la producción de secuencias de los clones generados. Mediante la clonación se pudo obtener rápidamente un número elevado de copias de la región ITS nu y por tanto de los posibles polimorfismos provocados por repeticiones de tamaño moderado del ADN (repeticiones en tándem) -Tabla 3.8-.

Existen numerosos trabajos en líquenes en los que se han utilizado técnicas de clonación, principalmente en la identificación y en la expresión de los genes de la poliquétido sintasa (PKS), ya que la clonación de los productos de PCR sirve en estos casos para obtener secuencias de mayor calidad de esta región. Así mismo, se ha usado también la clonación para la obtención de ADN líquénico en muestras que presentan contaminaciones por otros hongos (Opanowicz et al. 2006; Schümann y Hertweck 2006; Chooi et al 2008; Lücking et al 2008; Mangold et al. 2008; Gagunashvili 2009; Hestmark et al. 2011). Sin embargo no existen precedentes en la clonación de especies del género *Rhizocarpon* ni en la clonación de las secuencias del ITS nu de líquenes.

Chang y LaBaer (2005) en el desarrollo de un Identificador de polimorfismos de ADN (*DNA polymorphism detector*, DPD), en secuencias obtenidas de clones de longitud mínima de 100 pb, consideran que los genes obtenidos son idénticos cuando como mínimo un 95% de las bases son idénticas. Utilizando el mismo criterio y dado que los clones obtenidos por nosotros produjeron secuencias idénticas en más del 97% de similitud, debemos considerar que no existen tampoco polimorfismos en la región ITS nu.

El heterotalismo y el homotalismo han sido asociados en líquenes a diferentes procesos de adaptación al medio: i.e. la procesos de auto fecundación por ausencia de un compañero compatible para la reproducción sexual (homotálico) quizás por aislamiento (Murtagh *et al.* 2000). Así mismo se ha constatado que el flujo de genes entre poblaciones puede facilitar que una población asexual pase a ser sexual heterotálica (Scheidegger y Werth 2009). Se han detectado heterotalismos en varios grupo de líquenes como *Parmeliaceae*, *Xanthoria* o *Cladonia* detectando elevados números de polimorfismos usando técnicas moleculares más exhaustivas, como de RAPD-PCR y AFLP-PCR (Murtagh *et al.* 2000; Honegger *et al.* 2004; Seymour *et al.* 2005; Honegger y Zippler 2007).

Ambas circunstancias (heterotalismo y homotalismo) son posibles en el grupo de *R. geographicum* si tenemos en cuenta que se trata de especies colonizadoras primarias de zonas alpinas, polares o zonas recientemente deglaciadas, con tasas de crecimiento muy lentas y una gran longevidad (Halle 1983; Armstrong 1983; Innes 1985; Sancho y Valladares 1993; Winschester y Chaujar 2002; Armstrong 2004; Sancho *et al.* 2007a).

Sin embargo, nuestros resultados mostraron bajos niveles de polimorfismo en los individuos analizados -Tabla 3.7 y 3.8-: lo más probable es que en los individuos analizados de *R. geographicum* s. lat. no presentan heterotalismo ya que las secuencias de ITS nu no muestran cambios suficientes como para considerarlas procedentes de individuos diferentes. Aunque no se puede descartar que exista heterotalismo en los individuos del grupo.

En conclusión no se han detectado en ITS nu ni duplicaciones de la secuencia ni polimorfismos genéticos suficientes como para asegurar la presencia de 2 individuos distintos en un mismo talo o hablar de una elevada variabilidad intra-específica en nuITS. Los cambios observados parecen ser debidos más a artefactos introducidos durante el proceso de clonación, a errores provocados en la reacción de secuenciación o variabilidad “intra-individuo” que a polimorfismos propiamente dichos.

Como consecuencia de las pruebas efectuadas mediante los dos experimentos descritos podemos respaldar que en nuestros marcadores filogenéticos no se han producido fallos en la extracción, en la purificación o en la secuenciación de las muestras que hubieran podido llevar a una errónea clasificación filogenética de estas.

Viabilidad en la utilización de genes de copia única: RPB1.

Los análisis filogenético basado en las regiones RPB1, ITS nu y LSU mt como el basado únicamente en las regiones ITS nu y LSU mt han generado árboles filogenéticos con longitudes de ramas muy cortas -Fig. 3.4 Árbol A y B respectivamente- que indican que el número de cambios es muy bajo tanto dentro como entre clados diferentes a nivel del grupo de *R. geographicum*. Que las longitudes de las ramas sean muy similares en ambos árboles nos da información acerca de la eficiencia en el uso de la subunidad grande de la RNA polimerasa II a este nivel filogenético, ya que en este sentido no parece estar proporcionando información extra a la obtenida del análisis de las regiones ITS nu y LSU mt.

Por otro lado vemos como los linajes filogenéticos definidos en el Capítulo 2 no aparecen como tales en los árboles -A y B- generados, pero no hay incongruencias. De hecho esta topología podría ser debida al bajo número de muestras de *R. geographicum* s. lat. utilizadas en estos análisis. A excepción de la posición en la que se encuentran los especímenes de *R. riparium* subsp. *lidsayanum* MAF-16638 y *R. sublucidum* MAF-16639, todos los demás clados que aparecen respaldados en el Árbol B, aparecen bien respaldados y con la misma topología en el Árbol A. Ambos árboles son prácticamente idénticos en cuanto a su topología y las probabilidades de los análisis filogenéticos realizados.

Aunque se ha documentado la eficiencia de la región RPB1 en los análisis filogenéticos realizados en líquenes (Crespo et al 2007; Ekman et al. 2008; Lücking et al. 2008; O'Brien et al. 2009; Crespo et al. 2010b; Wedin et al. 2011), nuestros resultados muestran: por un lado que los *primers* generales de RPB1 (Matheny et al. 2002) no son lo bastante eficientes para la secuenciación de *R. geographicum* s. lat. al proporcionar alrededor de un 30% de secuencias con baja calidad que no pudieron ser utilizadas en los análisis filogenéticos, por lo que sería conveniente el diseño de *primers* específicos para *R. geographicum* s. lat. si se quisiera seguir trabajando con esta región.

Por otro lado este marcador, al menos los *primers* utilizados, no aportaría información extra lo suficientemente relevante como para ayudar a resolver la filogenia dentro del grupo de *Rhizocarpon geographicum* por lo que no se realizó el diseño de *primers* específicos ni se elevó el número de muestras secuenciadas.

CONCLUSIONES

Tras haber realizado experimentos de re-amplificación y re-secuenciación así como los análisis por clonación de las secuencias de ITS nu del llamado grupo de *Rhizocarpon geographicum*, podemos dar por verificados los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos del Capítulo 2 y por extensión del Capítulo 5 ya que no se han detectado polimorfismos que hubieran podido cambiar dichos resultados.

Otras conclusiones son:

- 1) Se descarta el heterotalismo en los individuos estudiados del grupo de *Rhizocarpon geographicum*, así como posibles fallos en los procesos de amplificación y secuenciación del ADN de ITS nu que hubieran podido interferir en los análisis filogenéticos realizados.
- 2) La clonación de la región ITS nu del ADNr de *Rhizocarpon geographicum* s. lat. proporcionó clones idénticos en su mayoría, no se detectaron polimorfismos genéticos, repeticiones en tándem y posibles duplicaciones de esta región en los individuos estudiados.
- 3) La utilización de la subunidad grande de la RNA polimerasa II -RPB1- como gen de copia única no aporta información suficiente como para mejorar la resolución de la filogenia del grupo de *Rhizocarpon geographicum*, así mismo los *primers* generales utilizados han resultado tener baja efectividad en la amplificación de secuencias del grupo.

**CAPÍTULO 4: Diversidad, filogenia y patrones
biogeográficos de los fotobiontes del grupo de
*Rhizocarpon geographicum***

**CHAPTER 4: Diversity, phylogeny and biogeographic
patterns in the photobionts of the
Rhizocarpon geographicum group**

ABSTRACT

INTRODUCTION

Lichens are a mutualistic association between fungi (mycobionts) and photoautotrophic green algae or cyanobacteria (photobionts). *R. geographicum* s. lat. is used in many studies, e. g. of lichenometry or biodeterioration, and the taxonomy of the group has been studied by different authors. However, little is known about the diversity or the phylogeography of its photobionts.

In this work we aim to study the phylogeography, genetic structure and ecological pattern of photobiont in this group. To reach the objective, the photobionts in *R. geographicum* group were identified using molecular methods. A comparative study of the phylogenetic structure of myco and photobionts is also presented in order to clarify the specificity and/or selectivity patterns.

The photobionts were studied at two different scales: in the Iberian Peninsula and in a worldwide distribution, identifying the photobiont species in the group, and analysing geographic and molecular diversity. Both studies provided additional information to improve knowledge in *R. geographicum* s. lat.

MATERIAL AND METHODS

A total of 50 specimens were studied in a local approach: 44 specimens from 7 localities in high altitudes in the Iberian Peninsula were studied together with 6 specimens from low altitudes - Table 4.1-. Details of location and collectors for taxa sampling are included in Chapter 2 Table 2.1. In a global study we included 49 specimens from 8 localities: Iberian Peninsula, Svalbard Is., North America (Alaska and Mexico), South America (Chile and Tierra de Fuego), Antarctica and India.

Molecular data were obtained from the nuITS region in the Iberian Peninsula photobionts study. In the global one we amplified nuITS and *rbcL* chloroplast DNA both for the photobionts. For mycobiont comparison we amplify the nuITS and mtLSU regions. Phylogenetic inference was performed using maximum parsimony (bootstrap $\geq 70\%$) analysis and bayesian inference (MC)³ tree - pp ≥ 0.95 -. DNA extraction, amplification, sequencing and alignment specifications are explained in General Methods.

Haplotype analysis was carried out with TCS 1.21 software calculating statistical parsimony networks for both regions in the local and global approaches. A distribution map was elaborated and molecular diversity was tested with DNASP v.5 software in both approaches. Also, different scenarios were tested with AMOVA analysis (Arlequin v. 3.11 software).

RESULTS AND DISCUSSION

R. geographicum s. lat. from the Iberian Peninsula preferably selected *Trebouxia jamesii* and *Trebouxia angustilobata* as symbiotic partner. Furthermore, some specimens from low altitudes are able to form symbiotic associations with *T. arboricola*, *T. incrustata* or *T. decolorans* species. We were not able to identify the species of 10 photobionts samples.

Biogeographic patterns -Fig. 4.3 and Table 4.5- showed that the most diverse locality was Sierra Nevada and *T. jamesii* clade A -Fig 4.2- had the widest geographical distribution. The photobiont diversity could be affected by altitude and latitude.

Intra-specific diversity in *T. jamesii* (with 12 haplotypes) and *T. angustilobata* (with 11 haplotypes) was high -Fig. 4.4 and Appendix 4A-. The most frequent haplotypes were not geographically isolated, but were shared between localities. AMOVA results showed no geographical distribution or isolation patterns by localities or major clades -Table 4.6-. Also, we compared the mycobiont lineages detected in Chapter 2 with photobiont species by AMOVA; both lineages were very similar in terms of photobiont species selection.

The global study showed a similar behaviour to the local one in the Iberian Peninsula: most of the photobiont samples formed a monophyletic clade (supported by high bootstrap and posterior probability), which included *T. jamesii* and *T. angustilobata* specimens -Fig. 4.5-. Indian samples formed a *Trebouxia* supported clade together with a Tierra de Fuego sample that could represent an undescribed species. We were not able to identify the *Trebouxia* species of 3 samples from Chile, Tierra de Fuego and Mexico.

Biogeographic patterns showed geographic isolation in clades 2 and 3: belonging every sample to the Iberian Peninsula. Clade 4 corresponds to South-America. However, clade 5 is bipolar - Fig. 4.5-. On the other hand, Tierra de Fuego has the highest genetic diversity -Fig. 4.6 and Table 4.7-.

More haplotypes were detected in nuITS (22 haplotypes) than in *rbcL* (12 haplotype) for the monophyletic clade gathering *T. jamesii* and *T. angustilobata* -Fig. 4.7 and Appendix 4-. Most frequent haplotypes were not geographically isolated. AMOVA results showed again no geographical distribution or isolation patterns in localities or major clades -Table 4.6-.

We didn't find specificity/selectivity nor co-evolution patterns by the mycobiont "morpho-species" toward the photobiont in the samples studied from a worldwide distribution -Fig. 4.8-.

High intra-specific diversity in *Trebouxia jamesii* and *T. angustilobata* was observed. Long-distance dispersion could be the most probable way to explain the worldwide distribution of photobionts in the *R. geographicum* group.

INTRODUCCIÓN

Un líquen es una asociación de tipo mutualista y estable, entre un hongo (micobionte), que actúa como exhabitante, y una población extracelular de un alga, unicelular o filamentosa, o una cianobacteria y que actúa como inabitante (el fotobionte) (Hawksworth y Honegger, 1994). Los nombres de las especies de líquenes y su sistemática se refieren al micobionte, de los que se conocen más de 15000 especies (Kirk *et al.* 2001; Feuerer 2011); mientras que los fotobiontes reconocidos en las distintas especies de líquenes son relativamente escasos y sólo se conocen aproximadamente 100 especies y 50 géneros (Ahmadjian 1967; Büdel y Henssen 1983; Nyati *et al.* 2007; Lücking *et al.* 2009).

Aunque son numerosos y variados los trabajos en los que se han utilizado individuos de *R. geographicum* s. lat. (Armstrong 1983; Bull y Brandon 1998; Nimis *et al.* 2002; De la Torre Noetzel *et al.* 2007; Jomelli *et al.* 2008; Sancho *et al.* 2011), y de que existen importantes trabajos taxonómicos sobre el grupo, centrados en el estudio de sus caracteres anatómicos -morfológicos y químicos- (Räsänen 1942a; Runemark 1956a; Thomson 1967; Feuerer 1978; Clayden 2004 etc.), poco conocemos acerca de la diversidad y la biogeografía de los fotobiontes presentes en las especies del grupo (apartado H de la Introducción general), más allá de que se trata de individuos del género *Trebouxia*, muy probablemente de *Trebouxia jamesii* (Ascaso y Galvan 1976; Peveling 1977; Armstrong y Smith 1996; Clayden 1998; Beck 1999) -Fig. 5.0-. El estudio de la filogenia, la diversidad y los patrones biogeográficos de sus fotobiontes es necesario para entender mejor el grupo de *R. geographicum*.

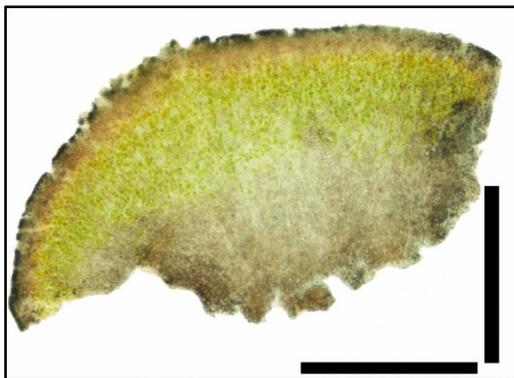


Figura 5.0.a.- Corte de la areola de *R. geographicum* s. lat. Escala 100µm

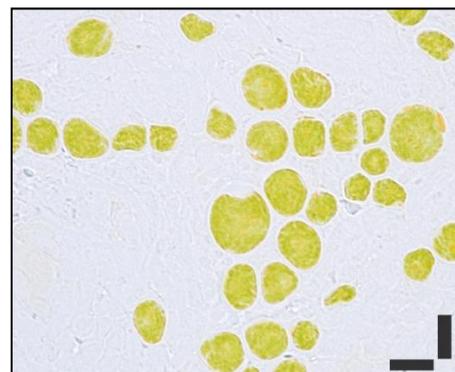


Figura 5.0.b.- Células de *Trebouxia* sp. en *R. geographicum* s. lat. Escala 10 µm

En este capítulo se estudiarán los fotobiontes realizando dos aproximaciones diferentes, la primera en un ámbito más local en la Península Ibérica, la segunda más global incluyendo individuos de localidades con distribución mundial, aportando así información complementaria que ayude a comprender mejor el comportamiento del grupo de *R. geographicum*. Se pretende así contestar a las siguientes preguntas:

¿Cuáles y cuántas son las especies de fotobiontes que realizan la simbiosis en el grupo de *R. geographicum*?

¿Cómo es la estructura genética de los fotobiontes presentes en el grupo?

¿Existen patrones biogeográficos de diversidad y distribución de los fotobiontes?

¿Cuál es el grado de especificidad/selectividad del micobionte hacia el fotobionte?

Se identificarán por tanto los fotobiontes del grupo de *R. geographicum* usando métodos moleculares, analizando la región ITS nu y la subunidad grande cloroplástica -*rbcLX*-, ambas regiones utilizadas en múltiples trabajos sobre filogenia de los fotobiontes (p. ej. Ohmura *et al.* 2006; Otálora 2008; Škaloud y Peksá 2008; Muggia *et al.* 2010; Werth y Sork 2010; Fernández-Mendoza 2011; Pérez-Ortega *et al.* 2012).

A menudo, los términos especificidad y selectividad son usados para definir el grado de interacción entre los micobiontes y los fotobiontes presentes en la simbiosis líquénica (Galun y Bubrick 1984; Beck *et al.* 2002), si bien el concepto de selectividad aplicada a uno de los dos simbiontes se suele referir al rango taxonómico del simbionte seleccionado (sea el fotobionte o el micobionte) (Beck *et al.* 2002). En nuestro trabajo se estudian ambos simbiontes conjuntamente basándonos en las identificaciones realizadas para los micobiontes de *Rhizocarpon geographicum* s. lat. y teniendo como objetivo principal conocer el grado de selectividad del micobionte hacia el fotobionte. Se comparan por tanto las estructuras filogenéticas de ambos simbiontes al tiempo que se estudian las posibles relaciones de especificidad entre ambos:

-Para identificar las especies del género *Trebouxia* y/o detectar los grupos naturales se realizan análisis filogenéticos de tipo bayesiano y de máxima parsimonia de los distintos *loci* estudiados para ambos simbiontes junto con otras secuencias “tipo” depositadas en el Genbank.

-Se estudia la estructura genética en las poblaciones identificadas y se establecen las correlaciones entre la diversidad de los fotobiontes estudiados y las zonas geográficas incluidas. Así se infieren las posibles relaciones de especificidad de las diferentes “morfo-especies” de *Rhizocarpon geographicum* s. lat. hacia el fotobionte, como también posibles patrones de selectividad de los 2 linajes detectados en el grupo para los estudios realizados en la Península Ibérica (Capítulo 2).

MATERIAL Y MÉTODOS

Medio físico y material biológico

Con respecto a los individuos utilizados en el análisis del fotobionte de la Península Ibérica se utilizaron un total de 44 individuos del grupo de *R. geographicum* procedentes de 7 localidades de alta montaña, de ambiente alpino y subalpino propio de zonas templadas (Rivas-Martínez 2010) por encima de los 1700 m de altitud, incluyéndose un mínimo de 5 individuos por cada localidad (Tabla 4.1). Además se incluyeron 6 individuos de 4 localidades secundarias, por debajo de los 1700 m, abarcando la diversidad de “morfo-especies” estudiadas dentro del grupo en la Península Ibérica y partiendo de la hipótesis de que a altitudes más bajas es probable que el fotobionte sea diferente. Dichas localidades fueron las estudiadas en el Capítulo 2 (Fig. 2.1), para especificaciones de recolección (coordenadas, altitud y recolector) se recomienda revisar la Tabla 2.1. En total se estudiaron 50 individuos del grupo (20 individuos del Linaje I y 30 del Linaje II del micobionte detectados en el Capítulo 2).

Para el análisis de los fotobiontes en ámbito mundial se han incluido un total de 49 individuos del grupo procedentes de 8 localidades diferentes (Fig. 4.1, Tabla 4.1 localidad e individuos con * y Tabla 4.2), incluyendo un mínimo de 5 individuos por localidad. Las especificaciones de coordenadas, altitud, fecha de recolección y recolector se detallan en el Apéndice 5 apartado A, en el que se han marcado los individuos estudiados con un *. Se han incluido un total de 16 “morfo-especies” del grupo de *R. geographicum*, abarcando la diversidad de especies estudiadas en ámbito mundial en el Capítulo 5, a excepción de *R. nidificum* por no disponer de dicho material cuando se realizó este experimento.

Tabla 4.1.- Localidad y Código de Herbario de las distintas “morfo-especies” del grupo de *R. geographicum* incluidos en el estudio para del fotobionte en la Península Ibérica. La localidad e individuos con un * son los incluidos como localidad Península Ibérica (PI) en el análisis realizado para el fotobionte a nivel mundial. En gris se indican los individuos de otros grupos del subgen. *Rhizocarpon* incluidos en los análisis del micobionte.

Localidades/Nº Individuos estudiados	Cód. Herbario / “Morfo-especie” del grupo (Linaje)
Ba/1 (Las Batuecas)	MAF-16651/ <i>R. drepanodes</i> (II)
CR/1 (Ciudad Real)	MAF-16653 / <i>R. tavaresii</i> (II)
LP/1 (Hija de Dios)	MAF-16673 / <i>R. lecanorinum</i> (II)
Hu/3 (Huesca)	MAF-16714 / <i>R. saanaëense</i> (II)
	MAF-16715 / <i>R. lecanorinum</i> (I)
	MAF-16881 / <i>R. sublucidum</i> (II)
(CG)/1 (Cruce de Guarazoca-Is. del Hierro)	MAF-17048 / <i>R. viridiatrum</i>
G/10 (Gredos)*	MAF-16656 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i> (II)
	MAF-16659* / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i> (I)
	MAF-16660* / <i>R. sublucidum</i> (I)
	MAF-16663 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i> (I)
	MAF-16664* / <i>R. sphaerosporum</i> (II)
	MAF-16666* / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i> (II)
	MAF-16667* / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i> (II)
	MAF-16668* / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i> (I)
	MAF-16671 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i> (II)
	MAF-16672* / <i>R. lecanorinum</i> (I)
L/6 (Pico Lobo)	MAF-16690 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i> (II)
	MAF-16691 / <i>R. sphaerosporum</i> (II)
	MAF-16694 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>riparium</i> (II)
	MAF-16695 / <i>R. tinei</i> (II)
	MAF-16696 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>riparium</i> (II)
	MAF-16698 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i> (II)
N/8 (Pico de La Najarra)	MAF-16635 / <i>R. macrosporum</i> (II)
	MAF-16639 / <i>R. sublucidum</i> (I)
	MAF-16642 / <i>R. tinei</i> (I)
	MAF-16643 / <i>R. sphaerosporum</i> (II)
	MAF-16645 / <i>R. sphaerosporum</i> (II)
	MAF-16646 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i> (II)
	MAF-16647 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i> (II)
	MAF-16648 / <i>R. alpicola</i>
Pi/5 (Pirineos)	MAF-16717 / <i>R. tinei</i> (I)
	MAF-16718 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i> (I)
	MAF-16719 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i> (I)
	MAF-16723 / <i>R. macrosporum</i> (II)
	MAF-16725 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i> (II)
SE/6 (Sierra de Estrella)	MAF-16704 / <i>R. tavaresii</i> (II)
	MAF-16705 / <i>R. lecanorinum</i> (II)
	MAF-16706 / <i>R. tinei</i> (I)
	MAF-16707 / <i>R. sublucidum</i>
	MAF-16710 / <i>R. sphaerosporum</i> (II)
	MAF-16713 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i> (II)
SF/5 (Sierra de Francia)	MAF-16732 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i> (I)
	MAF-16734 / <i>R. sublucidum</i> (I)
	MAF-16737 / <i>R. macrosporum</i> (I)
	MAF-16738 / <i>R. drepanodes</i> (I)
	MAF-16741 / <i>R. macrosporum</i> (II)
SN/6 (Sierra Nevada)	MAF-16677 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i> (I)
	MAF-16679 / <i>R. tavaresii</i> (II)
	MAF-16683 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i> (I)
	MAF-16688 / <i>R. sublucidum</i> (I)
	MAF-16689 / <i>R. lecanorinum</i> (I)
	MAF-16676 / <i>R. superficiale</i> subsp. <i>superficiale</i>

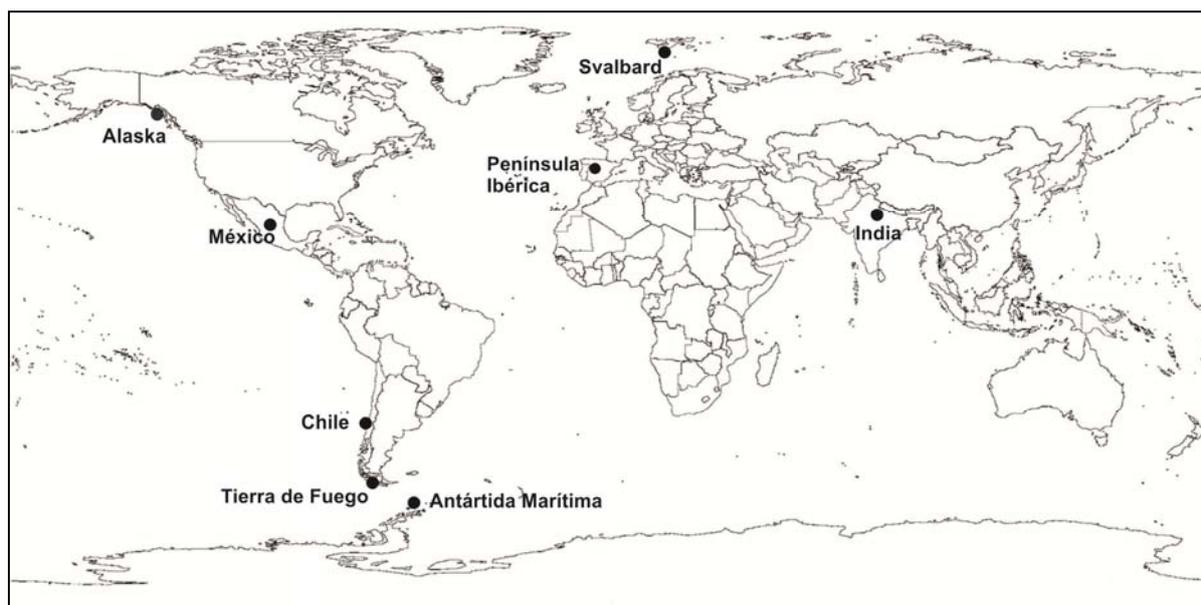


Figura 4.1.- Mapa de las localidades de recolección a escala mundial.

Tabla 4.2.- Localidad y Código de Herbario de las distintas “morfo-especies” del grupo de *R. geographicum* incluidas en el estudio del fotobionte a nivel mundial.

Localidad (Abreviatura/Nº Individuos estudiados)	Cód. Herbario / “Morfo-especie” del grupo
Alaska (Al/6)	MAF-17633 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i> MAF-17634 / <i>R. tinei</i> MAF-17635 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i> MAF-17636 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i> MAF-17637 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i> MAF-17638 / <i>R. tavaresii</i>
Antártida Marítima (AnM/6)	MAF-17689 / <i>R. lecanorinum</i> MAF-17691 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i> MAF-17692 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i> MAF-17693 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i> MAF-17693 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i> MAF-17698 / <i>R. tinei</i>
Chile (Ch/5)	MAF-17670 / <i>R. ferax</i> MAF-17671 / <i>R. sublucidum</i> MAF-17672 / <i>R. tinei</i> MAF-17674 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i> MAF-17675 / <i>R. macrosporum</i>
India (I/7)	MAF-17730 / <i>R. drepanodes</i> MAF-17731 / <i>R. sphaerosporum</i> MAF-17734 / <i>R. sphaerosporum</i> MAF-17735 / <i>R. tavaresii</i> MAF-17736 / <i>R. macrosporum</i> MAF-17738 / <i>R. sublucidum</i> MAF-17739 / <i>R. lecanorinum</i>
México (Mx/7)	MAF-17651 / <i>R. macrosporum</i> MAF-17652 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i> MAF-17653 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i> MAF-17654 / <i>R. tinei</i> MAF-17655 / <i>R. macrosporum</i> MAF-17656 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i> MAF-17657 / <i>R. macrosporum</i>

Tabla 4.2.- (Continuación)	
Localidad (Abreviatura/Nº Individuos estudiados)	Cód. Herbario / “Morfo-especie” del grupo
Svalbard (Sv/5)	MAF-17603 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i> MAF-17604 / <i>R. macrosporum</i> MAF-17606 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i> MAF-17607 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i> MAF-17613 / <i>R. macrosporum</i>
Tierra de Fuego (TF/6)	MAF-17676 / <i>R. tinei</i> MAF-17678 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>riparium</i> MAF-17679 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i> MAF-17680 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i> MAF-17681 / <i>R. tinei</i> MAF-17684 / <i>R. ferax</i>

En ambas aproximaciones se han mantenido los nombres de las “morfo-especies” del grupo de *R. geographicum* para analizar en profundidad posibles patrones de especificidad fúngica hacia el fotobionte.

Secuenciación de ADN y análisis filogenético

Se ha secuenciado el ADN del fotobionte para 92 individuos del grupo de *R. geographicum*, según las condiciones de extracción de ADN detalladas en la Metodología General. En el caso de los individuos de la Península Ibérica se amplificó el segmento ITS nu-1T (Kroken y Taylor 2000) y LR1 (Vilgalys y Hester 1990)-. Para los individuos analizados en ámbito mundial además del segmento ITS nu se amplificó adicionalmente la subunidad grande cloroplástica *-rbcLX-* codificante para la proteína RuBisCO (ribulosa-1 5-bifosfato carboxylasa /oxigenasa) utilizando los *primers rbcL* 1400 Forward-Reverse (Ohmura pers. comm. 2010) obteniendo secuencias parciales para dicha región. Ambos segmento, ITS nu y *rbcL* se amplificaron según bajo condiciones de PCR idénticas que se indican -Tabla 4.3-, utilizando el termociclador TP240 (Takara Bio) (National Museum of Nature and Science - TNS- Japan, Tsukuba Botany Department).

Tabla 4.3.- Condiciones de PCR para el locus <i>rbcL</i> 1400.		
Temperatura (°C)	Tiempo (minutos-segundos)	Ciclos
95 °C	30 seg	3
68 °C	30 seg	
72 °C	1 min.	
95 °C	30 seg	3
65 °C	30 seg	
72 °C	1 min.	
95 °C	30 seg	4
60 °C	30 seg	
72 °C	1 min.	
95 °C	30 seg	30
55 °C	30 seg	
72 °C	1 min.	

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis (Metodología General) y la purificación se realizó con el kit comercial de Enzimas Illustra ExoSAP-IT™ PCR Clean Up (GE Healthcare) según las condiciones indicadas en la Metodología General.

La secuenciación se llevó a cabo en el Centro de Secuenciación del Museo Nacional de Ciencia y Naturaleza de Japón (TNS), donde se utilizó el secuenciador automático CEQ8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter), usando el kit comercial DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y utilizando los mismos primers que se han indicado para la amplificación en la reacción de secuenciación. Las secuencias producidas fueron revisadas, ensambladas y comparadas como se indica en la Metodología General, así mismo las regiones ambiguas fueron eliminadas del alineamiento.

Como *outgroup* se utilizaron las secuencias de *Trebouxia higginsiae* (Hildreth & Ahmadjian) Gärtner en los análisis para la Península Ibérica y la secuencia de *Trebouxia gelatinosa* Ahmadjian ex Archibald para los análisis a nivel mundial. Además se añadieron 15 secuencias de ITS nu de diferentes especies del género *Trebouxia* para la identificación del fotobionte en la Península Ibérica. De estas 15 especies se han incluido 8 de ellas, -ITS nu y *rbcL*-, para el estudio a nivel mundial del fotobionte como se indica en la Tabla 4.4, todas ellas obtenidas del GenBank.

Tabla 4.4.- *Outgroup* (en negrita) y especies del género *Trebouxia* utilizadas para el estudio del fotobionte en *Rhizocarpon geographicum* s. lat.--- Indica los individuos no utilizados para el estudio a nivel mundial (sin secuencias de *rbcL*).

Especie	Nº Acceso GenBank	
	ITS nu	<i>rbcL</i>
<i>Trebouxia angustilobata</i> Beck	AF128271	JF502557
<i>Trebouxia arbolicola</i> de Puym.	AJ969611	AM158960
<i>Trebouxia asymmetrica</i> Friedl & Gärtner	AJ249565	---
<i>Trebouxia corticola</i> (Archibald) Gärtner	AB177821	---
<i>Trebouxia decolorans</i> Ahmadjian	AJ969545	AJ969657
<i>Trebouxia flava</i> Archibald	AF242467	AJ96963
<i>Trebouxia galapagensis</i> (Hildreth & Ahmadjian) Gärtner	AJ249567	---
<i>Trebouxia gelatinosa</i> Ahmadjian ex Archibald	Z68698	AJ969641
<i>Trebouxia gigantea</i> (Hildreth & Ahmadjian) Gärtner	AJ249577	---
<i>Trebouxia higginsiae</i> (Hildreth & Ahmadjian) Gärtner	AJ249574	---
<i>Trebouxia impressa</i> Ahmadjian	AJ249570	---
<i>Trebouxia incrustata</i> Ahmadjian ex Gärtner	AJ293795	---
<i>Trebouxia jamesii</i> (Hildreth & Ahmadjian) Gärtner	Z68700	AJ969663
	AJ431574	---
<i>Trebouxia potteri</i> Ahmadjian ex Gärtner	AF242469	AJ969635
<i>Trebouxia showmanii</i> (Hildreth & Ahmadjian) Gärtner	AF242470	AJ969661
<i>Trebouxia usneae</i> (Hildreth & Ahmadjian) Gärtner	AJ249573	---

El análisis bayesiano (MC)³ se realizó asumiendo en todos los casos el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica GTR+ I+ G (*General Time Reversible*) (Rodríguez *et al.* 1990), teniendo en cuenta la distribución de cambios entre las bases nitrogenadas. En el caso de los análisis para la identificación de los fotobiontes de la Península Ibérica se corrieron 2 *runs* paralelos, 4 millones de generaciones y 8 cadenas. Para los análisis realizados en el estudio a escala mundial, tanto para el micobionte como para el fotobionte, se corrieron 4 *runs* paralelos, 6 millones de generaciones y 8 cadenas. Cada 1000 árboles muestreados, un árbol fue salvado en un archivo generado por el programa, eliminando los 1.000 primeros árboles como *burn-in* para el fotobionte y los 3000 primeros para el micobionte en el análisis comparado a nivel mundial. Todos los análisis se realizaron teniendo en cuenta la partición de cada región, cuando fue necesario, como independiente una de otra e indicando al análisis que se detuviera cuando la desviación estándar alcanzara el p-valor por debajo del valor de significancia 0.01.

El análisis de MP tanto para los árboles filogenéticos de los fotobiontes como para del micobionte, se llevó a cabo siguiendo las especificaciones detalladas en la sección correspondiente de la Metodología General.

En los análisis filogenéticos del micobionte se utilizaron 3 individuos pertenecientes a los grupos *Alpicola*, *Superficiale* y *Viridiatrum* tal y como se indica en la Tabla 2.2 con el fin de fijar correctamente las relaciones filogenéticas con el grupo de *R. geographicum*. Como grupo externo se utilizó la secuencia de *Cetraria aculeata* para ambos loci, incluyéndose también un individuo de *Parmelina tiliacea*, tal como se indicaba en la Metodología general (Tabla 3) y se realizaron los análisis filogenéticos del micobionte en los Capítulos 2 y 3.

Análisis de haplotipos, diversidad molecular y estructura genética

Utilizando como base los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos se realizaron diferentes análisis con respecto a la diversidad y a la estructura genética de los fotobiontes:

-Mapas de diversidad específica: se elaboraron 2 mapas, uno para la Península Ibérica y otro a escala mundial, sobre los que se dibujaron diagramas con la frecuencia de aparición de cada clado monofilético por localidad muestreada detectado en los análisis de filogenia.

-Cálculo de las redes de haplotipos de los clados principales detectados. Esto se ha resuelto con el programa TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000), usando un análisis estadístico por parsimonia, considerando los *gaps* como un quinto carácter, y fijando una restricción máxima según cada *loci*: para la matriz del ITS nu utilizado en los análisis de la Península Ibérica se fijó el límite de conexión en 60 pasos; en los análisis a escala mundial, para la matriz del ITS nu se fijó el límite de conexión en 35 pasos y para la matriz de *rbcL* se fijó en un 95 % de verosimilitud. En todas las matrices se eliminaron las posiciones finales con zonas ambiguas (Ns).

-Diversidad molecular de las poblaciones estudiadas: utilizando el programa DNASP v.5 (Librado y Rozas 2009), en el que se introdujeron las secuencias para cada *loci* estudiado por separado, excluyendo las zonas ambiguas (con Ns) y teniendo en cuenta los *gaps* como un carácter más. En el caso de los análisis de las matrices para los *loci* ITS nu y *rbcL* en el estudio a escala mundial se excluyeron las secuencias de los individuos MAF-16672 y MAF-17674 por contener zonas ambiguas demasiado grandes al principio y final de la secuencia e incluirlas suponía recortan el alineamiento tanto que excluía tramos de secuencia informativos para otros individuos. De este análisis se obtuvieron valores para los polimorfismos de ADN (S), el valor de π (número de mutaciones por secuencia, i.e., diversidad de nucleótidos, Nei 1987), valores de Hd (diversidad de haplotipos, Nei 1987) y número de haplotipos por localidad estudiada tanto dentro de la Península Ibérica como en ámbito mundial. Valores de π cercanos a 1 indica que todos lo nucleótidos son muy distintos, mientras que valores cercanos a 0 indican que todos los nucleótidos son muy similares. Hd con valores iguales a 1 indican que cada secuencia es un haplotipo diferente e iguales a 0 indican la presencia de un único haplotipo.

-AMOVA (*Analysis of molecular variance*) (Excoffier *et al.* 1992): usando el programa Arlequín 3.11 (Excoffier *et al.* 2005), se utilizó el modelo nucleotídico JC69 (Jukes and Cantor 1969), haciéndose un cálculo estandarizado de las AMOVAS y evaluando la significancia de estas con un test al azar de 10^3 permutaciones. El aislamiento genético entre poblaciones se ha calculado mediante el valor de *pairwise Fst* ϕ (Lynch y Crease 1990) calculando la distancia genética entre poblaciones con 100 permutaciones y 0,05 como valor de significancia.

RESULTADOS

Estudio del fotobionte en la Península Ibérica

Se han generado un total de 50 secuencias nuevas de la región ITS nu de los 50 individuos del grupo de *R. geographicum* estudiados, con las que se produjo un alineamiento de 598 pb, del que se obtuvo una matriz 595 caracteres de los cuales 404 fueron informativos para la región ITS nu del fotobionte. A partir de dicha matriz se obtuvo un árbol consenso 50% *Majority Rule* obtenido a partir de 17080 árboles muestreados por análisis Bayesiano (MC)³ -Fig. 4.2-. El análisis de MP considero 185 caracteres constantes, 253 como caracteres parsimónicamente informativos y 157 caracteres variables fueron parsimónicamente no informativos. Queda por tanto patente el alto valor informativo de la región ITS nu en el caso de los fotobiontes y su utilidad para la identificación de las especies por técnicas exclusivamente moleculares. El detalle de los valores de los parámetros de probabilidad del análisis bayesiano puede verse en el Apéndice 3 apartado A. 1.

En el árbol filogenético obtenido vemos como la mayoría de los individuos se agrupan en 3 clados -A, B y C-: un 40% de los individuos (20 de 50) se agrupan junto a *Trebouxia angustilobata* (Clado C), mientras que 28% (14 de 50) son identificados como la especie *Trebouxia jamesii* (Clado A). Además, 2 individuos han sido identificados como pertenecientes a la especie *Trebouxia incrustata* (Clado 4), y encontramos un ejemplar identificado como *Trebouxia arboricola* (Clado 2) y otro como *Trebouxia decolorans* (Clado 3). Por otro lado 12 de los individuos estudiados (24% del total) no han podido ser identificados a nivel de especie, sin embargo se encontrarían dentro del género *Trebouxia* (Clado 1a, 1b y 1c), por lo que podrían corresponder a especies aún no descritas.

Con respecto a las localidades geográficas donde se realizaron los muestreos, a las “morfo-especies” de micobionte estudiadas en el grupo de *R. geographicum*, y contrastando, tanto las localidades como las “morfo-especies”, con respecto a los clados de *Trebouxia* detectados, encontramos que: en el Clado 1a hay cinco “morfo-especies” (de micobionte) de 3 localidades distintas; *R. tavaresii*, *R. sublucidum* y *R. geographicum* subsp. *frigidum* de SN, *R. macrosporum* de Pi y *R. riparium* subsp. *riparium* de L. El Clado 1b formado por dos individuos de dos morfo-especies de 2 localidades diferentes: *R. lecanorinum* de SN y *R. riparium* subsp. *lindsayanum* de G.

El Clado 1c, con cinco individuos de cinco “morfo-especies” de 4 localidades distintas: *R. tavaresii* CR, dos individuos de *R. lecanorinum* de LP y Hu, *R. tinei* y *R. sphaerosporum* de SE. Tres de estas localidades, Hija de Dios, Ciudad Real y Huesca, son localidades por debajo de los 1700 m de altitud. Así este clado es el que mayor diversidad de “morfo-especies” y localidades geográficas presenta. En el Clado 2 aparece *R. saanaëense* de la localidad Hu, muestreado también por debajo de los 1700 m de altitud, y en el Clado 3, *R. sublucidum* de Sierra Nevada, formando juntos un clado monofilético. En el Clado 4 de *Trebouxia incrustata* los dos individuos que lo forma pertenecen a dos “morfo-especies” del grupo distintas de dos localidades diferentes: *R. drepanodes* de Ba y *R. lecanorinum* de la SE.

Por otro lado, el Clado A que corresponde a *Trebouxia jamesii*, incluye 14 individuos, separados en dos clados monofiléticos, el primero con 10 individuos pertenecientes a seis “morfo-especies” procedentes de 4 localidades: dos individuos de *R. geographicum* subsp. *geographicum* ambos de Pi, otros dos individuos de *R. tinei* de N y Pi, y dos más de *R. riparium* subsp. *lindsayanum* también de la N y Pi, *R. sublucidum* y *R. geographicum* subsp. *frigidum* ambos de la N y *R. geographicum* subsp. *prospectans* de G. El segundo con tres individuos de tres “morfo-especies” y 2 localidades ambas del Sistema Central de la Península Ibérica: dos individuos de *R. geographicum* subsp. *frigidum* de G y la SF y uno de *R. riparium* subsp. *lindsayanum* de G. A este clado se une un individuo de *R. macrosporum* de la SF.

Por último el Clado B de *Trebouxia angustilobata* con 20 individuos de 11 “morfo-especies” recolectados en 5 localidades, todas ellas del Sistema Central de la Península Ibérica: un individuo de *R. tavaresii* de la SE, tres individuos de *R. sublucidum* de G, SE y SF, dos individuos de *R. macrosporum* de la N y la SF, un individuo de la “morfo-especie” *R. geographicum* subsp. *diabasicum* de G, cuatro individuos de *R. sphaerosporum* dos de ellos de la N, uno de G y otro de L, cuatro individuos de *R. riparium* subsp. *lindsayanum* de G, dos de L y uno más de SE, un individuo *R. geographicum* subsp. *prospectans* de G, otro de *R. tinei* de L, un individuo de *R. riparium* subsp. *riparium* de L, otro de *R. drepanodes* de SF y por último un individuo de *R. lecanorinum* de G. Se recomienda revisar la Tabla 4.1.

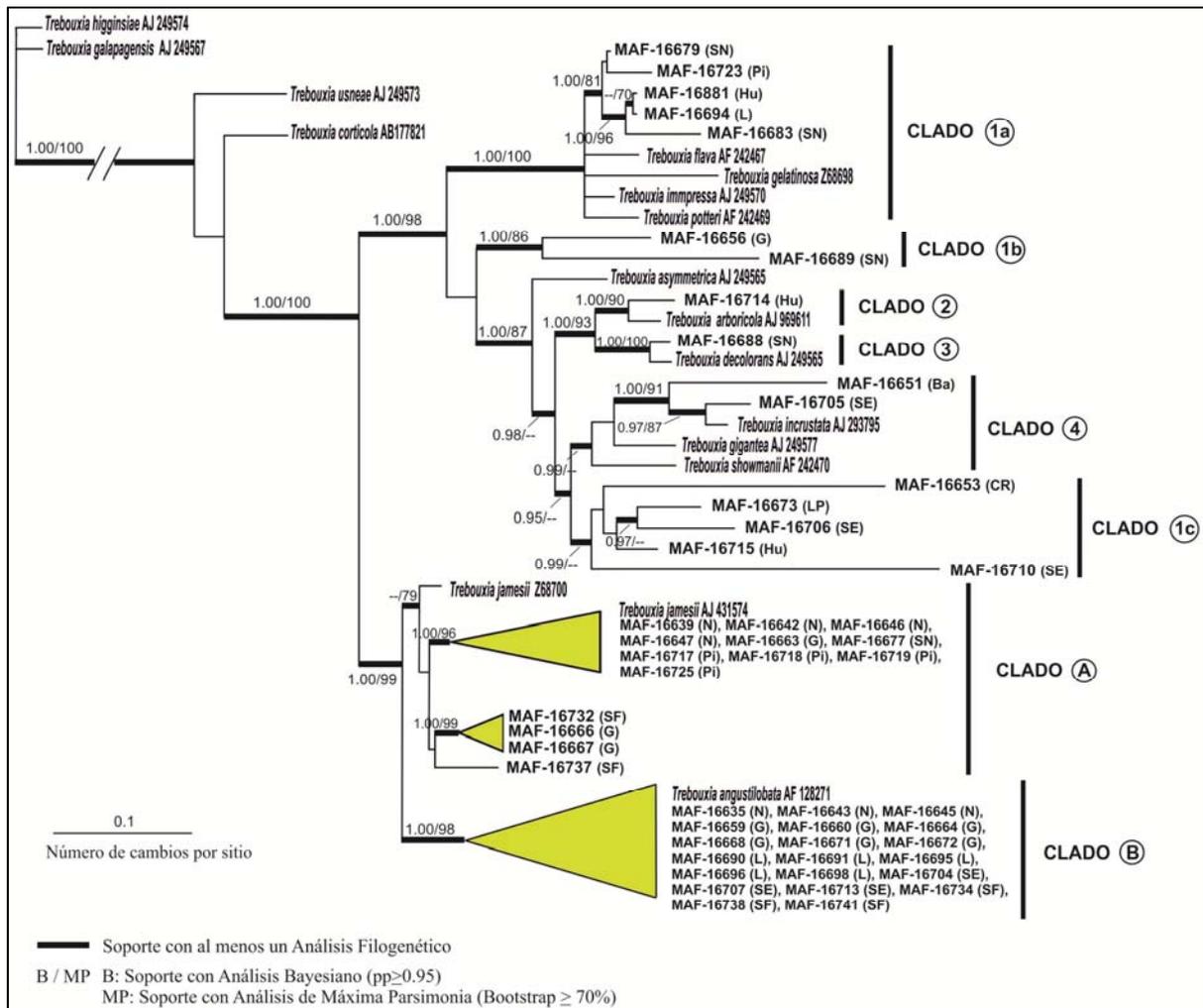


Figura 4.2.- Árbol filogenético para la identificación del fotobionte presente en el grupo de *R. geographicum* en la Península Ibérica. Árbol 50% *Majority Rule* a partir de 17080 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ de la región ITS nu. Clado 1a, b y c indican los fotobiontes pertenecientes al género *Trebouxia* pero no identificados a nivel específico; Clado 2, 3 y 4 los fotobiontes pertenecientes al género *Trebouxia* identificados como *T. arboricola*, *T. decolorans* y *T. incrustata*; Clado A los fotobiontes identificados como *T. jamesii* y el Clado B los fotobiontes identificados como *T. angustilobata*. Junto al número de MAF identificador para cada individuo aparece en paréntesis la abreviatura de la localidad en la que fue muestreado.

Con los clados detectados en la Fig. 4.2 se ha construido el mapa de la Fig. 4.3 en el que se representa la diversidad filogenética del fotobionte detectada en cada una de las 7 localidades principales estudiadas en la Península Ibérica (cada una con una frecuencia de al menos cinco individuos). A cada clado monofilético se le dio un color diferente en los gráficos como se indica en el mapa. Así, Sierra Nevada es la localidad más diversa en cuanto al alga, que podría incluir cuatro especies diferentes de fotobionte. Siguen a continuación la Sierra de Estrella y Gredos con tres posibles especies distintas. En el resto de localidades de la Península Ibérica se observan como máximo dos especies diferentes del género *Trebouxia*.

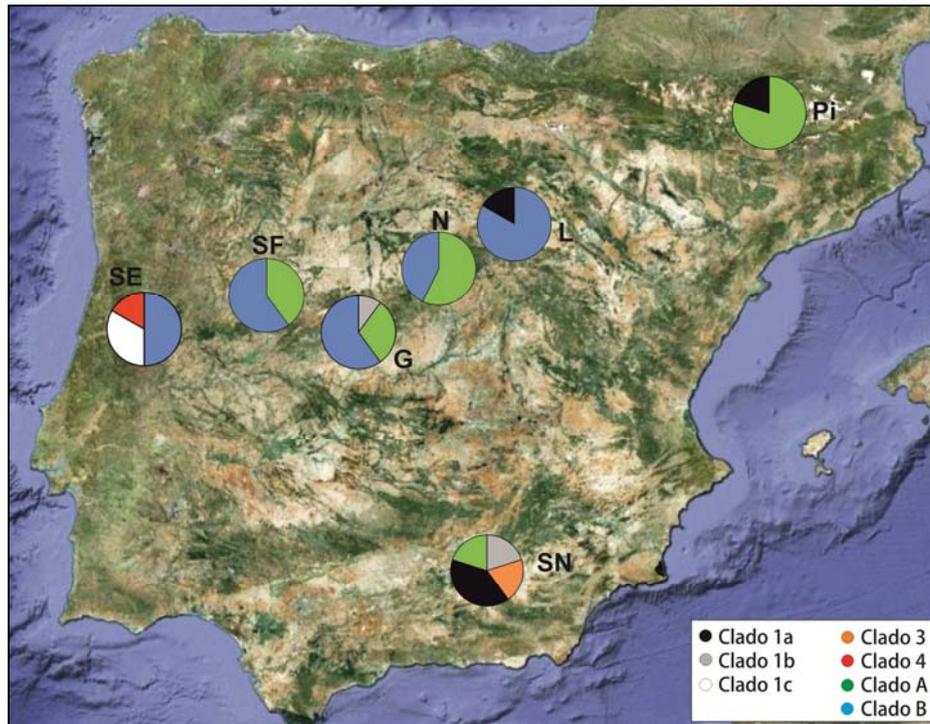


Figura 4.3.- Mapa de diversidad de especies de fotobionte en la Península Ibérica por análisis de la región ITS nu. Cada clado detectado en la Fig. 4.2 fue codificado con un color distinto.

La Fig. 4.4 representa las redes de haplotipos del marcador ITS correspondientes a los dos grandes clados obtenidos en el análisis filogenético: *T. jamesii* (Clado A) y *T. angustilobata* (Clado B). El número de individuos que comparten cada haplotipo se indica junto con el nombre dado a este. Se detectaron 11 haplotipos distintos en las secuencias de ITS correspondientes a *T. jamesii* y 12 para *T. angustilobata*, siendo más diverso en número de haplotipos con respecto al número de individuos analizados en *T. jamesii* que en *T. angustilobata*. Además, ambas especies estarían separadas tan sólo por 29 cambios entre las secuencias de Tang1 y Tjam1 que además serían los haplotipos más frecuentes. Tang1 tiene una frecuencia de ocho individuos que proceden de 4 localidades del Sistema Central: G, L, N y SF. El haplotipo Tjam1 esta compartido por cuatro individuos de 2 localidades muy alejadas geográficamente: N y Pi. El resto de haplotipos tiene una frecuencia muy baja, de tan solo un individuo por haplotipo.

No se han incluido los haplotipos de otras especies de *Trebouxia* como *T. arboricola* o *T. decolorans* ni de las especies no identificadas del género por estar representadas con una frecuencia muy baja, habiéndose identificado cada individuo como un haplotipo diferente. En el Apéndice 3 apartado B se dan las correspondencias entre el número de haplotipo y los individuos que lo componen.

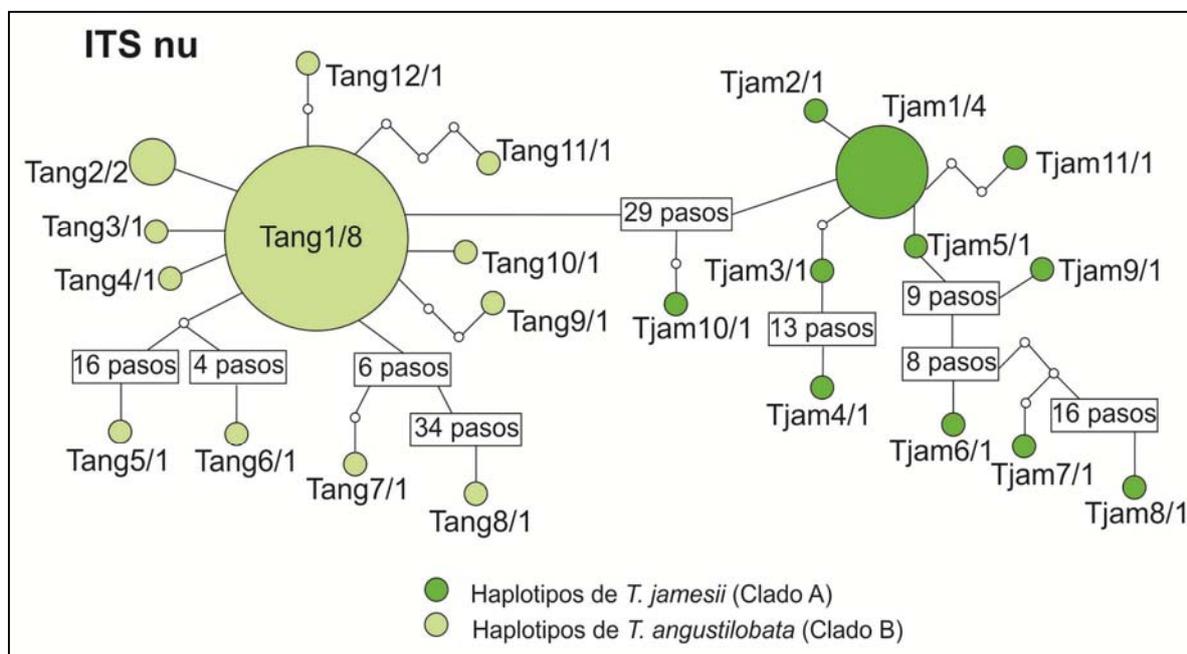


Figura 4.4.- Redes de haplotipos detectados para la región ITS nu del fotobionte estudiado en la Península Ibérica. Haplotipos de *T. jamesii* y *T. angustilobata*. El número de muestras que comparten el mismo haplotipo se da después del número de haplotipo. El tamaño de los círculos es proporcional al número de muestras que comparten el haplotipo.

En la tabla 4.5 se muestran los resultados de los análisis de diversidad genética por localidad muestreada: las localidades con mayor diversidad genética serían Sierra Nevada y Sierra de Estrella con los valores más elevados para S (sitios polimórficos), π (diversidad nucleotídica) y Hd (diversidad de haplotipos por localidad). Gredos sería la siguiente localidad más diversa, pero con un valor de π bajo ($=0.059$). Además, los valores obtenidos para la totalidad del muestreo de la Península Ibérica muestra una diversidad genética muy elevada con 302 sitios polimórficos de un total de 489 sitios analizados, lo que nos da una idea de la alta variabilidad del *locus* ITS nu.

Tabla 4.5.- Valores de diversidad genética del fotobionte para el locus ITS nu en la Península Ibérica. Se dan los valores de diversidad por localidad estudiadas (teniendo en cuenta las 7 localidades principales con más de 5 individuos en el muestreo) y del muestro total. n; número de individuos estudiados, h; número de haplotipos encontrados, Hd; diversidad de haplotipos, π ; diversidad nucleotídica.

Localidad	Polimorfismos de ADN detectados		n	h	Hd	π
	Nº sitios analizados	Sitios Polimórficos (S)				
G	571	114	10	9	0.97	0.059
L	595	88	6	4	0.80	0.049
N	595	47	7	5	0.90	0.038
Pi	594	94	5	4	0.90	0.063
SE	595	223	6	6	1.00	0.171
SF	573	57	5	5	1.00	0.050
SN	593	181	5	5	1.00	0.165
Total PI	489	302	50	32	0.93	0.111

En el análisis de estructura genética del fotobionte en la Península Ibérica -Tabla 4.5- los valores obtenidos para la AMOVA con respecto a la geografía muestran que: (i) que no existe aislamiento geográfico de los fotobiontes ya que la varianza dentro de cada localidad estudiada es mucho más elevada que entre localidades. (ii) Que teniendo en cuenta únicamente los Clados A y B de *T. jamesii* y *T. angustilobata* los resultados mostraron igualmente la ausencia de aislamiento. (iii) con respecto a los dos linajes del micobionte de la Península Ibérica detectados en el Capítulo 2, dieron valores elevados de la varianza dentro de cada linaje, aunque el p-valor no fue significativo. (iv) tomando únicamente los Clados A y B con respecto a los citados linajes del micobionte, la varianza también fue elevada y el p-valor significativo dentro de cada linaje indicando que para ambos clados los linajes son muy similares en cuanto a estas especies, por lo que no habría selectividad de los linajes hacia una u otra especie de *Trebouxia*.

Tabla 4.6.- Análisis de la varianza molecular (AMOVA) de la región ITS nu del fotobionte en la Península Ibérica. i) Aislamiento geográfico, ii) Aislamiento geográfico sólo para los Clados A y B del fotobionte de la Fig. 4.2, iii) Comparativa con los linajes del micobionte del grupo *R. geographicum* detectados en el Capítulo 2, iv) Comparativa con los linajes del micobionte sólo para los Clados A y B del fotobionte. En negrita se indican los porcentajes totales significativos para la varianza.

Fuente de la Varianza	Componentes de la Varianza		p-valor	Fst ϕ
	Varianza	% Total		
i)Entre localidades	7.56	26.58	<0.05	0.26
Dentro de las localidades	20.90	73.44		
ii)Entre localidades	2.87	24.94	<0.05	0.25
Dentro de las localidades	8.65	75.06		
iii)Entre linajes	0.30	1.08	0.21±0.01	0.01
Dentro de los linajes	27.53	98.92		
iv)Entre linajes	1.62	13.64	<0.05	0.13
Dentro de los linajes	10.27	86.36		

Estudio del fotobionte a escala mundial

Para el estudio del fotobionte a escala mundial se han generado 98 secuencias nuevas de los individuos del grupo de *R. geographicum* estudiados: 49 secuencias completas de la región ITS nu y 49 secuencias parciales de la región *rbcL*. Dichas secuencias fueron revisadas y alineadas según se explica en la Metodología general, obteniéndose una matriz final de 596 caracteres para el ITS nu, de los cuales 271 fueron informativos, y otra matriz de 1246 caracteres para la región *rbcL* con 129 caracteres informativos. Obteniéndose una matriz general de 1843 pb de las cuales 495 eran caracteres informativos.

A partir de dicha matriz se obtuvo un árbol consenso 50% *Majority Rule* obtenido a partir de 27440 árboles muestreados por análisis Bayesiano (MC)³ -Fig. 4.5-. El análisis de MP considero 1416 caracteres constantes, 259 como caracteres parsimónicamente informativos y 168 caracteres variables fueron parsimónicamente no informativos. Vuelve a quedar patente el valor informativo del *locus* ITS nu, que será fundamental en nuestro caso para el estudio a nivel de especie. El detalle de los valores de los parámetros de probabilidad del análisis bayesiano puede verse en el Apéndice 3 apartado A.2.

En el árbol filogenético obtenido vemos como un 79,5% de los individuos estudiados (39 de 49) se encuentran formando un gran clado monofilético junto con individuos de *T. jamesii* y *T. angustilobata* cuyas secuencias fueron obtenidas del Genbank. En dicho clado encontramos 4 clados monofiléticos más pequeños: Clado 2 que incluye a *T. angustilobata* en cinco muestras de la Península Ibérica; el Clado 3 agrupa a tan sólo dos individuos también procedentes de la Península Ibérica; el Clado 4 reúne ocho individuos cuatro de los cuales son de Tierra de Fuego y cuatro de Chile y por último el Clado 5 con 23 individuos que es el más amplio agrupando a un 46,9% del muestreo total. Los individuos de este clado proceden de 5 localidades: los muestreos completos de Alaska y Antártida Marítima, seis individuos de México, cuatro individuos de Svalbard y uno de Tierra de Fuego.

Los Clados 3, 4 y 5 podrían identificarse como *T. jamesii* ya que por ejemplo el Clado 3 corresponde con individuos que quedaron ubicados en el Clado A del análisis correspondiente a las muestras de la Península Ibérica (Fig. 4.2) que aparecían junto a una secuencia de *T. jamesii*. Sin embargo no es descartable la opción de considerar que el conjunto de los Clados 2, 3, 4 y 5 (con una elevada probabilidad posterior y *bootstrap*) podría tratarse de un linaje o una subespecie nueva de *T. jamesii*.

Además, todos los individuos estudiados de la India (Clado 1) forman un clado monofilético junto con 1 individuo de Tierra de Fuego. Las secuencias correspondientes a los individuos MAF-17654 (Mx), MAF-17607 (Sv) y MAF-17670 (Ch) anidan en diferentes ramas del árbol filogenético y serán tratados como *Trebouxia* sp.

Con respecto a las “morfo-especies” de micobionte se ha generado un árbol filogenético que se ha comparado con el árbol del fotobionte, como se mostrará más adelante (Fig. 4.8).

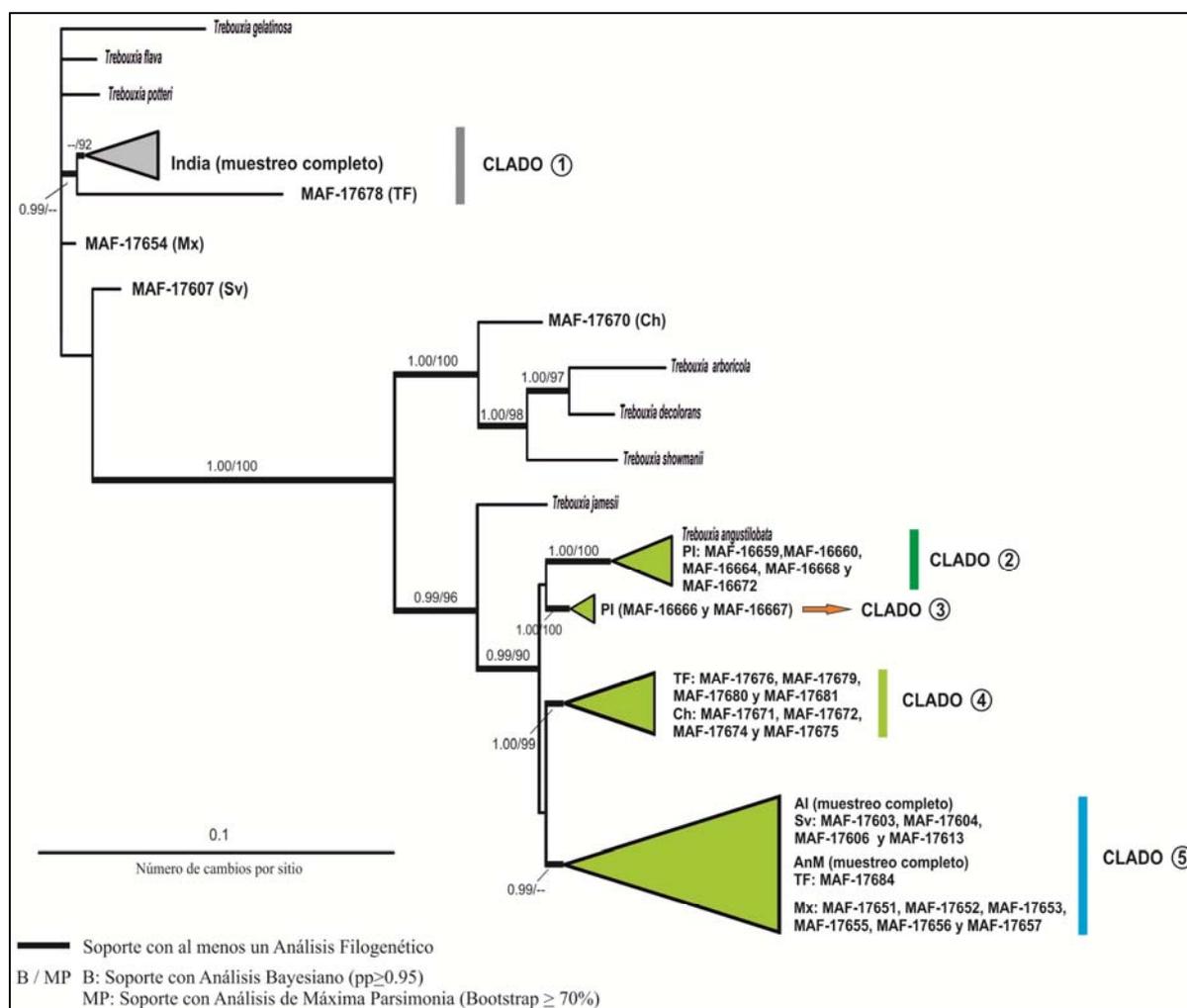


Figura 4.5.- Árbol filogenético del fotobionte presente en el grupo de *R. geographicum* en ámbito mundial. Árbol 50% *Majority Rule* a partir de 27440 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ de la región ITS nu. Clado 1 indica fotobiontes pertenecientes al género *Trebouxia* especie no identificada; Clado 2, 3, 4 y 5 los fotobiontes pertenecientes al género *Trebouxia* identificados *T. jamesii* y *T. angustilobata*. Junto al número de MAF identificador para cada individuo aparece en paréntesis la abreviatura de la localidad en la que fue muestreado. Las barras y la flecha de colores identifican a los clados tal y como aparecen en la Fig. 4.6.

Con los clados detectados en la Fig. 4.5 se ha construido un mapa -Fig. 4.6- en el que se representa la diversidad filogenética del fotobionte a escala mundial detectada en cada una de las 8 localidades estudiadas. A cada clado monofilético se le dio un color diferente en los gráficos como se indica en la leyenda del mapa.

Así, la localidad Tierra de Fuego sería la más diversa conteniendo lo que podrían ser tres especies diferentes de fotobionte. Las localidades de Alaska, Antártida Marítima e India serían las menos diversas, mientras que el resto de localidades (SV, PI, Mx y Ch) estarían compuestas por lo que podrían ser 2 especies diferentes de *Trebouxia*.

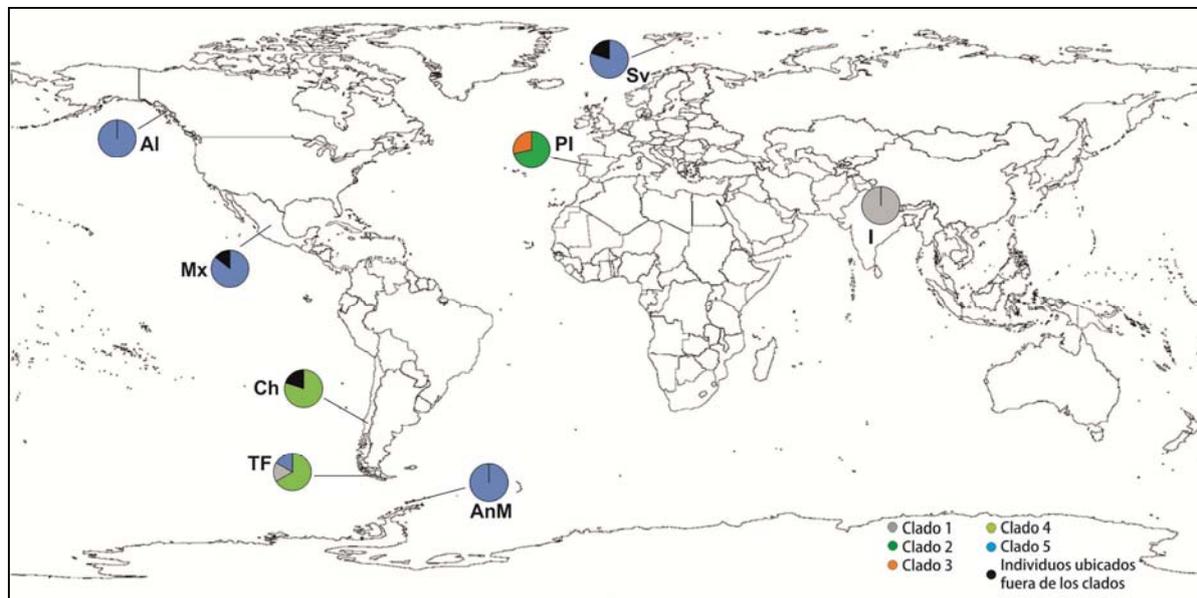


Figura 4.6.- Mapa de diversidad de especies de fotobionte a escala mundial por análisis de las regiones ITS nu y *rbcL*. Cada clado detectado en la Fig. 4.4 fue codificado con un color distinto.

La Fig. 4.7 representa las redes de haplotipos detectadas para cada uno de los *loci* estudiados (ITS nu y *rbcL*). Junto con el nombre dado a cada haplotipo se indica el número de individuos que lo comparten. Se detectaron un total de 29 haplotipos distintos para la región ITS nu y 16 haplotipos diferentes para la región *rbcL*. En ambos casos la mayor frecuencia de haplotipos se encontró en el Clado 5 del árbol filogenético. Además, en este estudio el *locus* ITS nu es mucho más variable que el *rbcL*:

Para la región de ITS nu el haplotipo más frecuente es el Thap1 compartido por 15 individuos procedentes de 4 localidades diferentes: Sv, Al, Mx y AnM, seguido del Thap23 y Thap24 ambos compartidos por tres individuos todos ellos de la India, el resto de haplotipos aparecen en frecuencias muy bajas, de tan sólo un individuo por haplotipo.

Con respecto a la región *rbcL* el más común es el haplotipo Thap1 compartido por 19 individuos de 6 localidades diferentes: Sv, Al, Mx, Ch, TF y AnM, seguido de Thap13 con una frecuencia de 7 todos ellos de la India, después el Thap6 compartido por cuatro individuos todos ellos de la PI, y el Thap3 compartido por tres individuos de la AnM y de Ch, el resto de individuos aparecen con frecuencias bajas de tan sólo uno o dos individuos.

En el Apéndice 3 apartado C se dan las correspondencias entre el número de haplotipo y los individuo/s que lo componen.

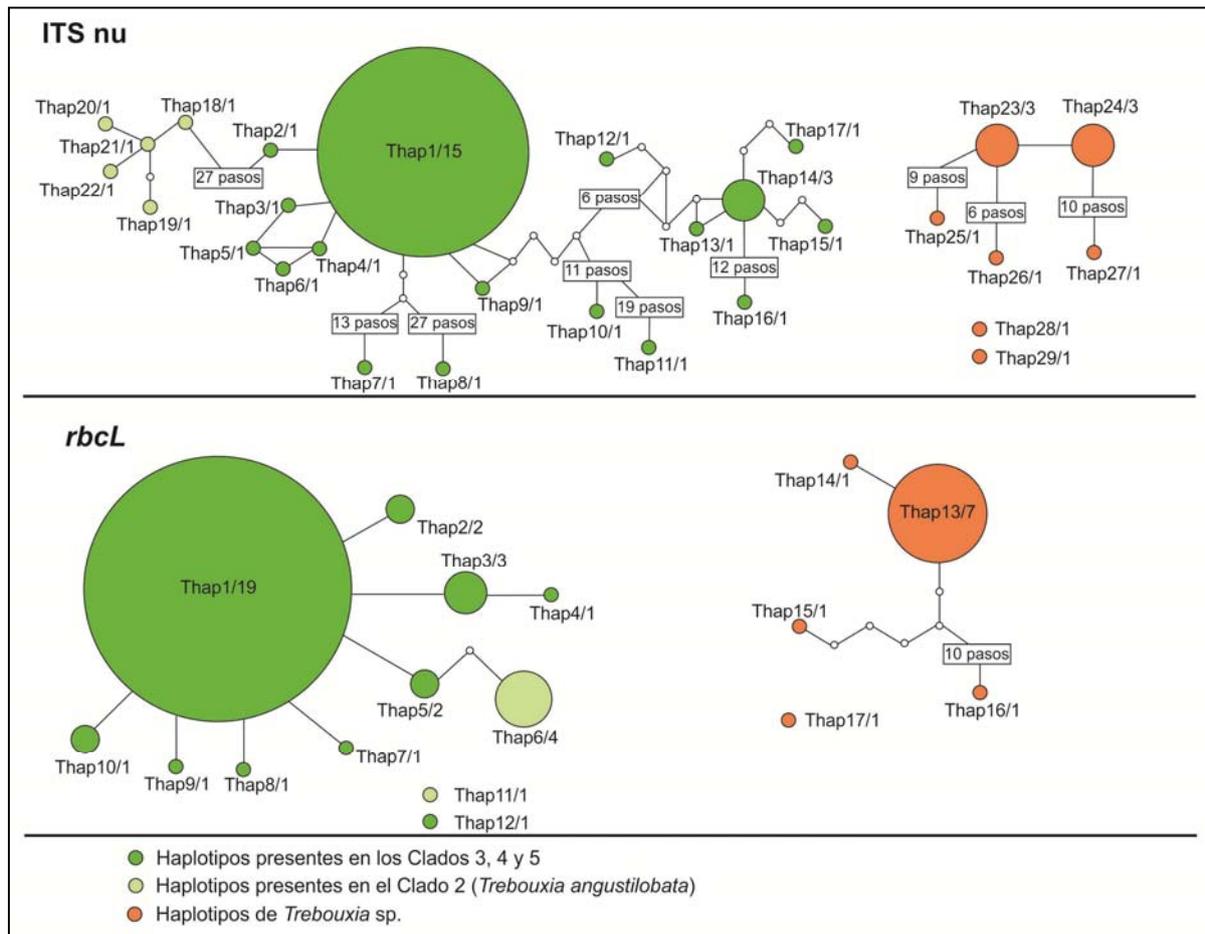


Figura 4.7.- Redes de haplotipos detectados para las regiones ITS nu y *rbcL* del fotobionte en ámbito mundial. El número de muestras que comparten el mismo haplotipo se da después del número de haplotipo. El tamaño de los círculos es proporcional al número de muestras que comparten el haplotipo.

En la Tabla 4.7 se muestran los resultados de los análisis de diversidad genética por localidad muestreada y para cada uno de los *loci* analizados. Las localidades con mayor diversidad genética serían, para el ITS nu la señaladas como PI y TF que aparecen con los valores más elevados de diversidad de haplotipos (Hd). Para el *locus rbcL* la localidad más diversa genéticamente es la AnM, el resto de localidades tienen valores muy bajos de Hd y de π (diversidad nucleotídica), incluso Al, con valores más altos de S para el *locus rbcL* presenta el mismo valor de diversidad nucleotídica que la región ITS nu. Llama la atención la localidad Mx cuyos valores de h y Hd son iguales para ambos *loci*, aunque *rbcL* sigue presentando menor diversidad nucleotídica que la región ITS nu.

Además, los valores obtenidos para la totalidad del muestreo a escala mundial muestra una diversidad genética muy elevada para ITS nu con 213 sitios polimórficos (S) de un total de 536 sitios analizados y mayores valores de h , Hd y π , que los detectados para el *locus rbcL* con tan sólo 83 sitios polimórficos de un total de 1228 y valores inferiores de h , Hd y π .

Tabla 4.7.- Valores de diversidad genética del fotobionte para cada *loci* estudiado (ITS nu y *rbcL*) a escala mundial. Se dan los valores de diversidad por localidad estudiada y por *loci*: primera línea ITS nu, segunda línea *rbcL*. n ; número de individuos estudiados, h ; número de haplotipos encontrados, Hd ; diversidad de haplotipos, π ; diversidad nucleotídica.

Localidad	Polimorfismos de ADN detectados		n	h	Hd	π
	Nº sitios analizados	Sitios Polimórficos (S)				
Sv	594	83	5	3	0.70	0.056
	1247	55	5	2	0.40	0.010
PI	570	4	7	7	1.00	0.031
	1030	20	7	3	0.66	0.005
Al	594	0	6	1	0.00	0.000
	1228	83	6	2	0.33	0.000
Mx	594	125	7	4	0.71	0.060
	1247	72	7	4	0.71	0.020
Ch	594	79	5	4	0.90	0.054
	1026	12	5	3	0.70	0.004
TF	564	119	6	5	0.93	0.070
	1247	70	6	3	0.60	0.010
AnM	594	1	6	1	0.00	0.000
	1247	4	6	5	0.93	0.001
I	541	8	7	3	0.71	0.004
	1247	0	7	1	0.00	0.000
Total muestreo	536	213	49	22	0.82	0.071
Mundial	1228	84	47	14	0.78	0.020

Se realizaron varios análisis de estructura genética (AMOVA) que pudieran explicar la dispersión y el aislamiento del fotobionte con respecto a la geografía -Tabla 4.8-: i) Para cada localidad geográfica incluida. ii) Para cada localidad excluyendo los individuos del Clado 1 y los dispersos en las ramas del árbol. iii) Hemisferio Norte-Hemisferio Sur. iv) Aislamiento geográfico por fragmentación de Laurasia y Gondwana. v) Aislamiento geográfico del continente americano junto a Svalbard y la Antártida Marítima frente a la Península Ibérica y la India. En el caso de i), iii) y iv) la varianza entre las localidades no es lo suficientemente alta como para asegurar que existiría aislamiento geográfico para cada una de ellas. En el caso de iii) y iv) al ser negativa la varianza entre los grupos éstos no son consistentes. Sin embargo en el supuesto ii) la varianza es mayor dentro de las poblaciones que entre estas, aunque de la misma manera, a no ser valores muy elevados y similares, no podemos decir con seguridad que los Clados 2, 3, 4 y 5 sean semejante geográficamente.

En el caso v) la varianza calculada entre los tres grupos es elevada, indicando que podría existir un aislamiento geográfico para cada uno aunque el p-valor no es significativo.

Tabla 4.8.- Análisis de la varianza molecular (AMOVA) de la región ITS nu y rbcL del fotobionte a escala mundial. i) Aislamiento geográfico por localidad estudiada, ii) Aislamiento geográfico por localidad excluyendo el Clado 1 y los individuos dispersos en diferentes ramas del árbol filogenético de la Fig. 4.5, iii) Aislamiento geográfico Hemisferio Norte/Hemisferio Sur, iv) Aislamiento geográfico Laurasia/Godwana, v) Aislamiento geográfico del continente americano junto a Svalbard y la Antártida Marítima frente a la Península Ibérica y la India

Fuente de la Varianza	Componentes de la Varianza		p-valor	Fst Φ
	Varianza	% Total		
i) Entre localidades	19.49	57.27	<0.05	0.57
Dentro de las localidades	14.54	42.73		
ii) Entre localidades	4.88	48.52	<0.05	0.48
Dentro de las localidades	5.18	51.48		
iii) Entre grupos	-0.91	-2.71	0.64±0.01	-0.02
Entre las localidades dentro de los grupos	19.96	59.42	<0.05	0.57
Dentro de las localidades	14.54	43.29	<0.05	0.56
iv) Entre grupos	-0.12	-0.37	<0.05	-0.003
Entre las localidades dentro de los grupos	19.56	57.57	<0.05	0.57
Dentro de las localidades	14.54	42.80	<0.05	0.57
v) Entre grupos	37.30	69.20	0.06±0.007	0.69
Entre las localidades dentro de los grupos	1.34	2.55	0.22±0.01	0.08
Dentro de las localidades	15.23	28.25	<0.05	0.71

Además se generó un segundo árbol consenso 50% *Majority Rule* a partir de 83080 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ para el análisis del micobionte -Fig. 4.8 B-. Se utilizaron dos matrices independientes de la región del ITS nu (498 caracteres de los que 186 eran informativos) y del LSU mt (388 caracteres de los que 39 eran informativos), obteniéndose una matriz general de 886 caracteres de los cuales 249 eran informativos. El análisis de MP considero 540 caracteres constantes, 240 como caracteres parsimónicamente informativos y 107 caracteres variables fueron parsimónicamente no informativos. Este árbol ha sido comparado con el generado para el fotobionte de la Fig. 4.5 -Fig. 4.8 A-. Para los valores de los parámetros de probabilidad del análisis bayesiano se recomienda revisar el Apéndice 3 apartado A. 2 y A.3.

En la Fig. 4.8 no se observa ningún patrón de especificidad hacia el fotobionte por parte del micobionte. Individuos de un mismo clado del fotobionte se encuentran dispersos entre varios clados del micobionte. Únicamente en clados pequeños del Árbol A, compuestos siempre por varias “morfo-especies” distintas, compartirían el mismo fotobionte.

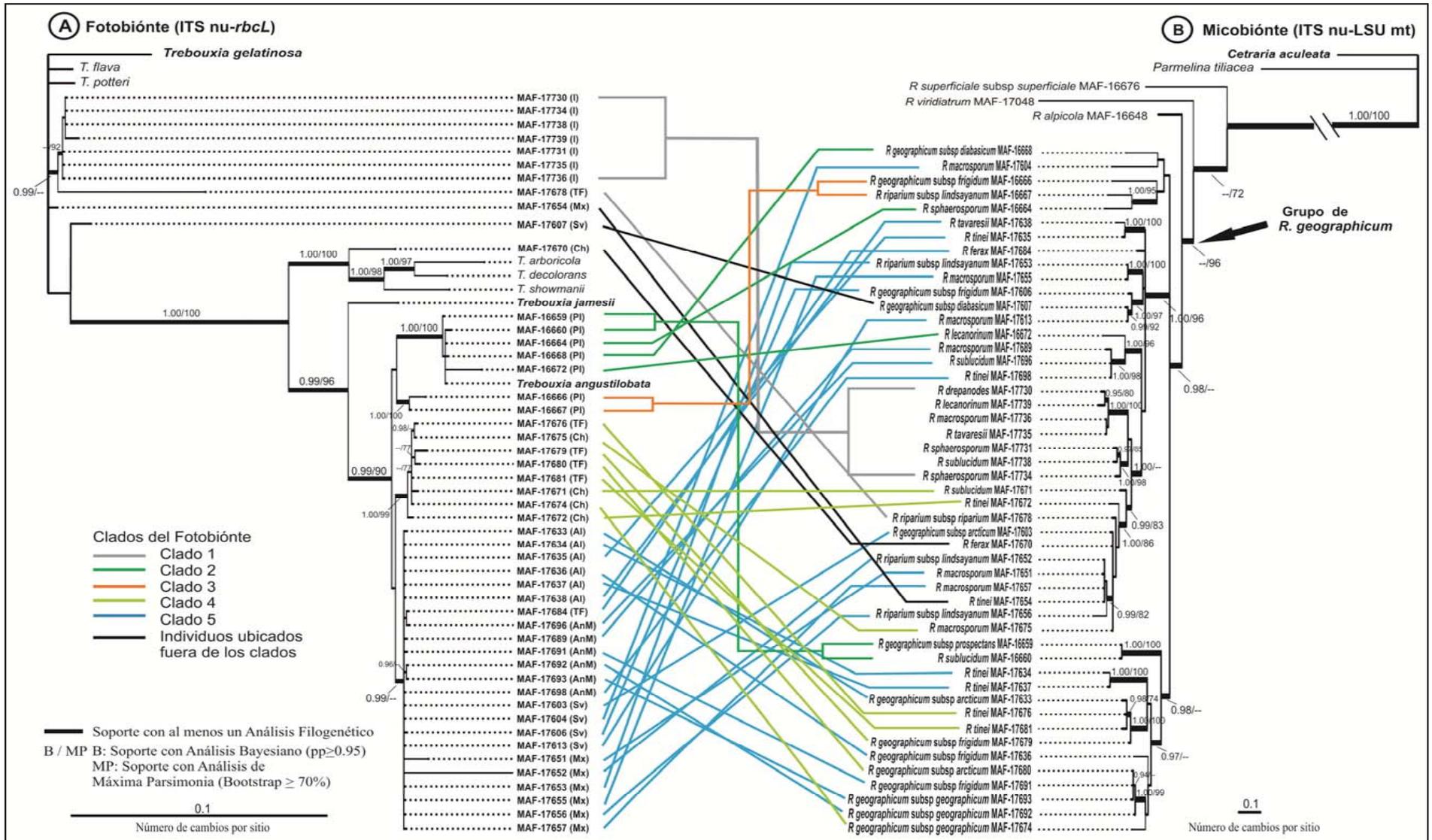


Figura 4.8.- Árbol filogenético fotobionte vs. micobionte del grupo de *R. geographicum* en ámbito mundial. Árbol A del fotobionte: árbol de la Fig. 4.5. Árbol B del micobionte: 50% *Majority Rule* a partir de 83080 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ de la región ITS nu y LSU mt. A cada clado identificado en el análisis del fotobionte se le ha otorgado un color diferente con el que se ha unido cada individuo con su correspondiente “morfo-especie” de micobionte del grupo de *R. geographicum*.

DISCUSIÓN

Estudio del fotobionte en la Península Ibérica

A través de la aproximación filogenética realizada para los fotobiontes presentes en el grupo de *R. geographicum* en la Península Ibérica (Fig. 4.2) se ha detectado que la especie más común con la que realizan la simbiosis es *T. angustilobata* (Clado B) seguida de *T. jamesii* (Clado A); ambas forman en un gran clado monofilético. En el género *Trebouxia* se incluyen los fotobiontes más comunes presentes en hongos liquenizados (Beck 1999; Hauck *et al.* 2007; Del Campo *et al.* 2010). Se trata de un género parafilético (Helms 2003) cuya taxonomía se encuentra aún incompleta, por lo que es probable que esté compuesto por numerosas especies aun hoy no descritas (Kroken y Taylor 2000; Ohmura *et al.* 2006; Hauck *et al.* 2007; Piercey-Normore 2006; Del Campo *et al.* 2010; Fernández-Mendoza *et al.* 2011). Esta deficiencia sistemática dificulta en muchas ocasiones la identificación molecular a nivel específico.

Se han detectado dos linajes de *Trebouxia*: un linaje que contiene el mayor número de individuos del grupo de *R. geographicum* analizados (Clados A de *T. jamesii* y B de *T. angustilobata*), que aparece como grupo hermano de otro linaje que contiene al resto de individuos estudiados junto con individuos de las especies de *T. flava*, *T. gelatinosa*, *T. impresa*, *T. potteri*, *T. asymmetrica*, *T. arboricola*, *T. decolorans*, *T. incrustata*, *T. gigantea* y *T. showmanii*. En este último linaje, a excepción de 4 individuos identificados como: *T. arboricola* (Clado 2, 1 individuo), *T. decolorans* (Clado 3, 1 individuo) y *T. incrustata* (Clado 4, 2 individuos), el resto de individuos estudiados no pudieron ser identificados molecularmente al no encontrarse similitudes por comparación con secuencias depositadas en la base del GenBank de especies del género *Trebouxia*. Este linaje (formado por las ramas más largas del árbol filogenético) podría contener nuevas especies de *Trebouxia* no identificadas: como ocurría en el trabajo de Hauck *et al.* (2007) en el que se describían nuevas especies de *Trebouxia* en base a los resultados obtenidos del análisis del *locus* ITS nu, como *T. hypogymniae*, y se elevaba al taxon *T. jamesii* subsp. *angustilobata* al nivel de especie, podría ocurrir que se tratase de nuevas especies del género *Trebouxia*. En cualquier caso, no se han descrito como nuevas especies y se han tratado como *Trebouxia* sp.

Por otro lado, *T. arboricola* y *T. decolorans* aparecen formando un clado monofilético que podría identificarse como una única especie. Beck (2002) y Helms (2003) propusieron la sinonimia de ambas especies, pero como en la literatura ambos nombres son aceptados se ha decidido tratarlas aquí como tales (AlgaeBase consultada 12/01/2013, Guiry y Guiry 2013).

Por encima de los 1700 m de altitud *T. jamesii* o *T. angustilobata*, aparecen como las especies más frecuentes de fotobionte en el grupo de *R. geographicum*. Además se ha observado que todos los individuos procedentes de localidades más bajas (< 1700 m: Ba, CR, LP y Hu) realizan la simbiosis con individuos de *T. arboricola*, *T. incrustata* y otras especies de *Trebouxia* no identificadas, pero nunca con *T. jamesii* o *T. angustilobata*. *T. jamesii* y *T. angustilobata* parece que podrían estar asociadas a *R. geographicum* s. lat. en altitudes más elevadas. Además, las especies no identificadas de *Trebouxia* también aparecen en altitudes elevadas en las localidades de G, L, Pi, SE y SN, en esta última localidad es más común los individuos de otras especies de *Trebouxia* que *T. jamesii* o *T. angustilobata*.

Una interpretación para explicar esta diversidad podría ser que la altitud en la Península Ibérica actuase como factor limitante para algunas especies de *Trebouxia*. La altitud como factor limitante en líquenes crustáceos ha sido confirmado en trabajos previos (Blaha *et al.* 2006; Muggia *et al.* 2008). En otros grupos y especies de líquenes se ha observado que la altitud y la latitud influyen en la diversidad de los fotobiontes, como en *Cetraria aculeata* (Fernández-Mendoza *et al.* 2011) o en varias especies de *Caloplaca* (Vargas Castillo y Beck 2012). Además Peksa y Škaloud (2011) comprobaron como el ambiente altitud influía en la diversidad del fotobionte. Sería interesante realizar un estudio comparativo de fotobiontes presentes en el grupo de *R. geographicum* a lo largo de un gradiente altitudinal y comprobar el grado de diversidad de fotobiontes y como favorecería está a la ocupación de diferentes nichos.

Analizando los patrones biogeográficos, los clados más diversos (con respecto a su distribución geográfica) son los Clados 1a y 1c de *Trebouxia* sp. Comparando el linaje del género *Trebouxia* que comprende los Clados A y B con la geografía, vemos como está principalmente compuesto por individuos del Sistema Central de la Península Ibérica. Aunque de los dos grandes clados, el Clado A es el más diverso geográficamente y reúne individuos procedentes de Pirineos y Sierra Nevada. El Clado B está compuesto en su totalidad por individuos muestreados en diferentes localidades del Sistema Central.

Además, la Fig. 4.3 (mapa de diversidad) y la Tabla 4.5 (diversidad genética por localidad), muestran que la localidad más diversa es la de Sierra Nevada ya que en ella se han detectado lo que podrían ser 4 especies diferentes de *Trebouxia*. Patrones de baja selectividad han sido observados en otros líquenes como

El análisis de las redes de haplotipos -Fig. 4.4- para los Clados A y B muestra que ambas son dos especies muy diversas genéticamente con más de 10 haplotipos distintos cada una. El haplotipo más frecuente, Tang1, está presente únicamente en el Sistema Central de la Península Ibérica, por lo que podríamos decir que este haplotipo estaría restringido a dicho sistema montañoso, que además es compartido por cuatro “morfo-especies” de micobionte del grupo de *R. geographicum*: *R. macrosporum*, *R. riparium* subsp. *lindsayanum*, *R. sphaerosporum* y *R. tinei*. El haplotipo Tjam1, el siguiente más frecuente, se encuentra en dos localidades alejadas geográficamente; la N del Sistema Central y la localidad Pi en los Pirineos. Este haplotipo sería además compartido por tres “morfo-especies” de micobionte: *R. geographicum* subsp. *geographicum*, *R. geographicum* subsp. *frigidum* y *R. riparium* subsp. *lindsayanum*.

Aunque aparentemente aparece un patrón de selectividad del haplotipo de alga (Tang1) por una especie fúngica en el caso de *R. sphaerosporum* la solidez de tal selectividad es cuestionable. Dado que el número de individuos estudiados (5) es muy insuficiente para respaldar cualquier patrón y no todos ellos se encontraron asociados a este haplotipo de alga, ya que uno de ellos realiza la simbiosis con la especie de alga identificada como *T. decolorans* (Clado 3).

Así, los haplotipos más frecuentes no se encuentran aislados por localidades geográficas sino son compartidos por varias localidades y por varias “morfo-especies” de micobionte. Es curioso comprobar como localidades que están relativamente alejadas comparten los mismos haplotipos de fotobiontes. Es el caso de *Cetraria aculeata* donde se detectó que individuos de poblaciones del polo norte y el polo sur compartían hasta 2 haplotipos (Fernández-Mendoza 2011)

Los análisis de la AMOVA muestran que las localidades estudiadas en la Península Ibérica son muy similares en lo que se refiere a sus fotobiontes. Se podría decir que existe un flujo abierto de intercambio de genotipos de fotobiontes entre las diferentes zonas estudiadas, sobre todo dentro del Sistema Central (que además comparten entre 5 localidades el haplotipo Tang1) y entre este y la cadena montañosa de los Pirineos (que compartirían un mismo haplotipo Tjam1). No aparece por tanto patrones de aislamiento geográfico para las diferentes especies identificadas, que además como se ha visto antes, son muy variables con respecto al número de haplotipos distintos que presenta cada una. Como ya se ha comentado esto ocurre en otras especies de líquenes en los que se detectó los mismos genotipos de fotobiontes en localidades muy alejadas (Fernández-Mendoza 2011).

Por otro lado, la hipótesis de que podría existir selectividad de cada uno de los linajes detectados para el micobionte en la Península Ibérica, queda descartada, ya que ambos linajes serían muy similares tanto en lo que se refiere a las especies identificadas como mayoritarias (*T. angustilobata* y *T. jamesii*) como al incluir todos los individuos de *Trebouxia*, lo que indica que no existiría selectividad, ni co-evolución, de ninguno de los dos linajes hacia especies concretas del género *Trebouxia*.

El grado de selectividad/especificidad del micobionte en la Península Ibérica sería en principio bajo: los individuos del grupo de *R. geographicum* aparecen en simbiosis con hasta 5 especies diferentes del género *Trebouxia* (*T. arboricola*, *T. decolorans*, *T. incrustata*, *T. angustilobata* y *T. jamesii*) y otras especies (posiblemente 3) que no se han podido identificar con la información disponible en el GenBank. Parece que los individuos del grupo realizarían la simbiosis con los fotobiontes que encuentren disponibles, aunque parece que existe cierto grado de preferencia por individuos de las especies *T. angustilobata* y *T. jamesii*, que además presentaron un elevado número de polimorfismos en sus secuencias, detectándose un alto número de haplotipos para cada una de estas especies.

Así, esta baja selectividad de los micobiontes en la Península Ibérica hacia el fotobionte les permite a los individuos de *R. geographicum* colonizar una mayor amplitud de hábitats donde encontrarían disponibles grupos diferentes de fotobiontes (Romeike *et al.* 2002; Wirtz *et al.* 2003). Este hecho es probable que esté relacionado con que se tratan de individuos primo colonizadores, como ya se observó en *Prototermeliopsis muralis* (Guzow-Krzeminska 2006).

Estudio del fotobionte en ámbito mundial

La filogenia a escala mundial de los fotobiontes del grupo de *R. geographicum* -Fig. 4.5- ha revelado la presencia de un linaje del género *Trebouxia* (Clado 1) que agrupa todos los individuos de la India junto con uno de Tierra de Fuego. Este linaje podría constituir una nueva especie del género como ya ha ocurrido con ciertos clados identificados en los análisis de la Península Ibérica; las similitudes encontradas en la búsqueda en el GenBank corresponden con secuencias de *Trebouxia* en los que no se especifica la especie. Como se ha dicho, la taxonomía del género *Trebouxia* presenta numerosos problemas (Kroken y Taylor 2000; Hauck *et al.* 2007; Piercey-Normore 2006). No siendo nuestro objetivo discutir la taxonomía de los fotobiontes, se ha tomado la determinación de no nombrar este clado como una nueva especie.

Para la descripción de nuevos taxones, es necesario incluir en un futuro más especímenes procedentes de la India y de otras localidades asiáticas, realizar cultivos de estos fotobiontes y estudiar la ultra-estructura de sus células -cloroplasto, pirenoide, etc.- (Friedl 1989; Beck *et al.* 1998; Muggia *et al.* 2010).

El resto de individuos, (a excepción de 3 de ellos que como ya se indicó, no se ha identificado el fotobionte), se encuentran ubicados en un gran linaje junto con *T. jamesii*. Dentro de este linaje hay dos grupos hermanos: Uno de ellos es el que constituye *T. jamesii* y el otro está formado por 4 clados. Uno de estos (Clado 2) es el de *T. angustilobata* que contiene únicamente individuos de la Península Ibérica PI. Un segundo clado menos numeroso (Clado 3) contiene también únicamente individuos de la localidad PI que fueron identificados como *T. jamesii* en el árbol filogenético de la Fig. 4.2. El Clado 4 y el Clado 5 podrían ser identificados como *T. jamesii*. Si observamos la longitud de las ramas de los Clados 3, 4 y 5 incluidos en el linaje de *T. jamesii*, vemos como estas tienen longitudes muy cortas en general (Fig. 4.5 y 4.8 árbol A), i.e. el número de sustituciones nucleotídicas por sitio es bajo, por lo que se podrían tratar a estos 3 clados como una única especie, *T. jamesii* (Beck *et al.* 1998; Beck 2002; Huelsenbeck y Ronquist 2001; Hauck *et al.* 2007).

Con respecto a la biogeografía en los Clados 2 y 3 existiría un patrón geográfico claro: solamente los individuos del grupo de *R. geographicum* muestreados en la Península Ibérica pertenecerían a estos clados. Por otro lado el Clado 4 es visiblemente sudamericano con individuos de Tierra de Fuego y Chile, mientras que el clado 5 es claramente bipolar con individuos procedentes de Svalbard, Alaska, México y la Antártida Marítima. Observando la Fig. 4.6 y la Tabla 4.7 de diversidad genética encontramos que la India, Alaska y la Antártida Marítima serían las localidades con menor diversidad específica y genética. En el otro extremo, la localidad de Tierra de Fuego sería la más diversa; en ella se detectaron individuos de *Trebouxia* ubicados en 3 clados diferentes en un muestreo de tan sólo 6 individuos, y además mostraron los valores más elevados de S, Hd y π para ambos *loci*.

Las redes de haplotipos obtenidas -Fig. 4.7- para ambos *loci*, muestran en primer lugar un mayor número de haplotipos para la región ITS nu (más variable) que para la región *rbcL* (menos variable): Thap1 es el haplotipo más frecuente para ITS nu con una frecuencia de 15, encontramos que individuos de Alaska, Svalbard, México y la Antártida Marina comparten el mismo haplotipo, con lo que se puede suponer que ha habido una dispersión a gran distancia de dicho haplotipo. Haplotipos de fotobiontes con una distribución geográfica similar se han detectado en otros talos líquénicos (Fernández-Mendoza 2011), pueden estar ocurriendo los mismo fenómenos de dispersión a larga distancia (Hertel 1987; Muñoz *et al.* 2004). Thap14 es el siguiente haplotipo de ITS nu más frecuente, compartido por 3 individuos: 2 de Tierra de Fuego y 1 de Chile, en este caso, la cercanía geográfica explicaría la presencia del mismo haplotipo de alga. Los haplotipos Thap23 y Thap24 con una frecuencia de 3 cada uno, están constituidos por individuos únicamente de la India, formarían junto con otro haplotipo de la India (Thap26), otro de Tierra de Fuego (Thap27) y otro de México (Thap25) una única red de haplotipos.

Así, las redes de haplotipos calculadas para ITS nu de (Tjam y Tang) en la Península Ibérica y las dos redes independientes de ITS nu a escala mundial, al encontrarse todos los haplotipos conectados en una única red, podría tratarse a cada red obtenida como un único taxón (Hart y Sunday 2007), i.e. en ámbito mundial se detectarían 2 taxones distintos, uno para la red de los Clados 2, 3, 4 y 5 y otro taxón de la red correspondiente al Clado 1 de la filogenia junto con el individuo MAF-17654 de México, mientras que en la Península Ibérica, el Clado A y B (Tjam y Tang respectivamente) podría tratarse de un único taxón.

En las redes generadas para la región *rbcL* el haplotipo más frecuente es el Thap1 con 19 individuos que lo comparten procedentes de Alaska, Svalbard, México, Chile, Tierra de Fuego y Antártida Marítima. El haplotipo Thap13 contiene 6 individuos de la India y 1 de Tierra de Fuego, formando además una red con Thap14 y Thap15.

En el caso de *R. geographicum* s. lat. el modo de reproducción más común es sexual por ascóspora, aunque Runemark (1956a) describió la presencia de picnidios en algunas especies amarillas de *Rhizocarpon*, en nuestros estudios nunca se observó estructuras reproductoras diferentes a los ascos. La dispersión a gran distancia de los fotobiontes podría explicarse gracias a las corrientes de aire (Hertel 1987; Muñoz *et al.* 2004) o por vectores animales que transporten no solamente las ascóspora del micobionte, -consideradas por algunos autores como el mejor agente de dispersión a larga distancia (Barkman 1958; Hedenås *et al.* 2003; Hughes *et al.* 2006)-, sino también células del fotobionte: e.g. por ingestión de parte del talo liquénico por distintos animales. Este es el caso de algunas especies de gasterópodos que influyen directamente en la dispersión a corta distancia de ciertas especies de líquenes, estudiados principalmente en relación a talos de *Lobaria pulmonaria*, sobreviviendo al proceso de digestión de estos animales tanto las ascósporas del micobionte como las células del fotobionte (Fröberg *et al.* 2001; Asplund y Gauslaa 2008; Boch *et al.* 2011). Lo mismo ocurre con ciertas especies de ácaros que también incluirían a los líquenes en su dieta y que además podrían ser transportados en migraciones de aves o en corrientes de aire, depositando más tarde sus heces en las que se han encontrado también ascósporas del hongo y células viables del alga, como ocurre en el caso de *Xanthoria parietina* (Meier *et al.* 2002).

En general podemos afirmar que la región ITS nu presenta una variabilidad mucho mayor que la región de la *rbcL* en los fotobiontes del grupo de *R. geographicum*, con valores más elevados de S , H_d y π , desmarcándose como el *locus* más adecuado en los estudios filogenéticos a nivel de especie (Beck *et al.* 1998; Kroken y Taylor 2000; Helms *et al.* 2001; Škaloud y Peksá 2010; Fernández-Mendoza *et al.* 2011; Pérez-Ortega *et al.* 2012). Nuestros resultados mostraron sin embargo que la región *rbcL* era más variable (mayores valores de S , H_d y π) en la localidad de la Antártida Marítima, por lo que debemos aconsejar siempre el uso de más de un *loci* y comparar las regiones estudiadas en profundidad (O'Brien *et al.* 2005; Werth y Sork 2008; Škaloud y Peksá 2010; Peksá y Škaloud 2011; Fernández-Mendoza *et al.* 2011). Así mismo, el número de haplotipos detectados para ITS nu en la Península Ibérica es muy elevado y en ámbito mundial es mayor que el detectado para el *locus rbcL*.

Los análisis de la AMOVA realizados para diferentes escenarios -Tabla 4.8-, muestran en general valores más elevados entre las poblaciones que dentro de ellas (i), lo que nos indica que las localidades muestran un elevado grado de aislamiento geográfico, hecho que contradice el resto de resultados discutidos. Sin embargo al excluir los individuos dispersos en las ramas del árbol filogenético y el Clado 1 (ii), analizando únicamente el linaje de *T. jamesii* con los Clados 2, 3, 4 y 5, nos encontramos con que los valores de la AMOVA son ligeramente más elevados dentro de las localidades, i.e., como ocurría en la Península Ibérica se podría decir que existe un flujo abierto de intercambio de genotipos de fotobiontes entre las diferentes zonas estudiadas, sobre todo entre Alaska, Svalbard, México y la Antártida Marítima donde el análisis está influenciado por unos pocos especímenes divergentes (Clado 5 del árbol filogenético).

Así no aparecería ningún patrón de aislamiento geográfico. Por otro lado las AMOVAS calculadas para comprobar si podría haber mayor similitud entre las localidades de uno u otro hemisferio y según su historia geográfica (iii y iv), no son consistentes, por lo que ninguna de las dos hipótesis serían válidas para explicar la dispersión de los fotobiontes presentes en el grupo de *R. geographicum*.

Sin embargo, las AMOVAS realizadas para comprobar el posible aislamiento de los fotobiontes en el continente americano, Antártida Marítima y Svalbard y el aislamiento de la Península Ibérica y la India (v) son llevados confirmando que estos grupos serían viables, aunque el p-valor se encuentra por debajo de los valores de significancia, sería aconsejable aumentar el muestreo tanto en número de individuos por localidad como localidades y comprobar que ocurriría entonces.

Al comparar los árboles filogenéticos del fotobionte frente a los del micobionte -Fig. 4.8-, vemos que en general existe baja selectividad del micobionte hacia el fotobionte; aunque la gran mayoría de los individuos del grupo de *R. geographicum* seleccionan fotobiontes de un mismo linaje de *T. jamesii*, en el encontramos un número muy elevado no sólo de haplotipos, sino de lo que podrían ser distintos linajes de *T. jamesii*, pudiendo tratarse o no de la mismas especies o subespecies, entre ellas *T. angustilobata* (Clado 2, 3, 4 y 5). Por otro lado además, vemos como algunos individuos del Clado 1 e individuos dispersos en las ramas del árbol del fotobionte (A), son especies no identificadas de *Trebouxia* sp. Es decir, que los fotobiontes detectados podrían ser de hasta 8 especies y subespecies diferentes del género *Trebouxia*. Es probable que según aumenta el área geográfica de dispersión del líquen, la especificidad del micobionte baje (Yahr *et al.* 2006).

Sería conveniente aumentar el muestreo y estudiar los fotobiontes de las comunidades de líquenes donde se recolectaron los individuos de *R. geographicum* s. lat. para comprobar la diversidad real de fotobiontes presentes en las localidades muestreadas (Beck 1999; Beck *et al.* 2002; Doering y Piercey-Normore 2009; Pérez-Ortega *et al.* 2012).

En resumen, el grado de selectividad del micobionte hacia el fotobionte para producir la simbiosis líquénica en el grupo de *R. geographicum* es bajo, no se podría explicar la selectividad por patrones geográficos, ya que fotobiontes de regiones geográficas muy alejadas aparecen juntos en clados monofiléticos. Estos clados aparecen además en diferentes “morfo-especies” del grupo de *R. geographicum*. Esta estrategia ayuda a explicar la distribución no sólo bipolar de *R. geographicum* s. lat. si no también su carácter como colonizador primario, y amplia distribución geográfica, que le va a permitir ocupar diferentes nichos, siendo capaces de colonizar mayor variedad de hábitats donde se cumplan los requerimientos ecológicos propios de *R. geographicum* s. lat. (Romeike *et al.* 2002; Wirtz *et al.* 2003; Guzow-Krzeminska 2006; Fernández-Mendoza *et al.* 2011).

CONCLUSIONES

En consecuencia a los resultados obtenidos en el estudio de los fotobiontes presentes en el grupo de *Rhizocarpon geographicum* podemos afirmar que son dos las especies de alga más comunes con las que realiza la simbiosis liquénica: *T. jamesii* y *T. angustilobata*, con una amplia distribución geográfica. Estas dos especies aparecen representadas por varios linajes filogenéticos en los que encontramos numerosos haplotipos diferentes, además de aparecer varias especies o subespecies de *Trebouxia* no identificadas. Así la selectividad encontrada del micobionte hacia el fotobionte es baja, lo que permite a *R. geographicum* s. lat. la colonización de diferentes nichos con una distribución bipolar y cosmopolita.

Otras conclusiones son:

- 1) No existe ni aislamiento ni ningún patrón geográfico que explique la distribución de los fotobiontes. Las especies, subespecies y diferentes haplotipos del género *Trebouxia* presente en *R. geographicum* s. lat. parecen distribuirse mediante un flujo abierto de intercambio de genotipos tanto a nivel local, en la Península Ibérica, como a nivel mundial entre la mayoría de las zonas estudiadas, interviniendo en ellos probablemente los procesos de dispersión a larga distancia. No existen patrones de co-evolución entre ambos simbioses.
- 2) Los fotobiontes del grupo de *R. geographicum* han resultado ser muy variables a nivel intra-específico detectándose numerosos sitios polimórficos y haplotipos distintos, sobre todo para la región ITS nu.
- 3) Los dos linajes de micobionte detectados en el Capítulo 2, no han presentado patrones de selectividad estrictos hacia los fotobiontes.
- 4) Es posible que los fotobiontes encontrados en la India constituyan, junto a 1 individuo de Tierra de Fuego, una especie nueva del género *Trebouxia*.

**CAPÍTULO 5: Filogenia, morfología y patrones
biogeográficos del grupo de *Rhizocarpon geographicum* a
escala mundial**

**CHAPTER 5: Worldwide phylogeny, morphology and
biogeographic patterns in the
Rhizocarpon geographicum group**

ABSTRACT

INTRODUCTION

Extensive glacier retreat has occurred in the last decades both in Arctic and Antarctic regions as well as in alpine areas in both hemispheres. Species included in the *Rhizocarpon geographicum* group are among the most important primary colonizers in de-glaciated landscapes, and are often used in lichenometry for dating moraines. *R. geographicum* s. lat. has a worldwide distribution. Preliminary molecular results (Chapter 2) suggest that species delimitations are not correct in the current circumscription of the group.

We study here the phylogeny of *R. geographicum* s. lat. to assess consistencies in worldwide scenery of the two lineages detected in Chapter 2. Also, we compare the phylogenetic results versus five significant morphological characters inferred in Chapter 2: apothecia diameter, number of cells in the ascospores, ascospores length and width, and epihymenium reaction to KOH. The species' type studied in Chapter 1 was contrasted with our materials. Molecular diversity was analyzed in the different lineages and sampled areas and the biogeographic patterns in the *R. geographicum* group were discussed.

MATERIAL AND METHODS

Specimens from different alpine zones of the Iberian Peninsula were studied together with samples from Svalbard Is., Scotland, Macaronesia -from Canary Is.- North America (Alaska, Rocky Mountain and Sequoia National Park), Central America (Mexico), South America (Chile and Tierra de Fuego), Antarctic Region (Continental and Maritime Antarctic), New Zealand, Taiwan and India. Fig. 5.1 shows the areas studied, Table 5.1 describes the areas' abbreviations and details of the locations. Collectors and herbarium code for taxa sampling are included in Table 5.2 and Appendix 5A. "Morpho-species" included in the *R. geographicum* group as well as some related taxa were analyzed in order to detect similarity among populations.

We compared information retrieved from morphological and chemical characters with molecular data obtained from the nuITS and mtLSU rDNA regions of 152 specimens. Phylogenetic inference was performed using maximum parsimony (bootstrap $\geq 70\%$) analysis and bayesian (MC)³ tree sampling (pp ≥ 0.95). DNA extraction, amplification, sequencing and alignment specification was described in General Methods.

Quantitative morphological characters -apothecia diameter (DAp), number of cells in ascospores (CSp), ascospores length (LgSp) and width (AnSp)- were tested by t-student (p-value ≤ 0.05 significant) and illustrated by Box-plots graphics with Statgraphics Plus v. 4.1. software Every character were compared with the phylogenetic tree topology obtained according with the rank established in Table 5.4 for DAp, CSp, LgSp and AnSp and epihymenium reaction to KOH + or -.

Type species was contrasted with our own materials, however only the characters related with ascospores were considered.

A worldwide lineages distribution map was elaborated, and molecular diversity was tested with DNASP v.5. In these two cases the locations of Rocky Mountain and Sequoia National Park were taken out due to the scarce number of available samples from both locations (less than 5).

RESULTS AND DISCUSSION

All the specimens studied from the *R. geographicum* group formed a monophyletic clade, supported by high bootstrap and posterior probability -Fig. 5.2-. We suggest that the genus *Rhizocarpon* needs a thorough revision based on both morphological and molecular data: our results showed that *Alpicola* and *Superficialis* groups could be polyphyletic.

“Morpho-species” included in the analysis showed polyphyletic patterns according with the results of Chapter 2. In fact critical morphological and chemical characters were distributed in different clades of phylogenetic tree in both lineages.

Our analysis showed that morphological characters traditionally used in the identification of species and subspecies within the *R. geographicum* group have proved to be insufficient leading to an inconsistent taxonomical arrangement.

In the monophyletic clade gathering the *R. geographicum* group, two lineages were detected; they are inconsistent with the current taxonomy inside the group. On the other hand they have no clear morphological characterization: apothecia diameter (Dap) and epihymenium KOH+ reaction were not significant for characterizing both clades. However, fine quantitative features of ascospores could characterize each one being significant in t-student test -Table 5.6 and Fig. 5.4-. Therefore two alternatives are possible: one is to keep a unique species synonym with 17 “morpho-species” studied here or split the Lineage I with smaller ascospores and Lineage II with bigger ascospores as two particular cryptic taxa. To support the second alternative some complementary population studies, enlarging taxa sampling through low lands, and including micro-ecological measures, are necessary.

Consequently, we propose to consider only one species *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. which includes the all 17 taxa. Thus the revisited concept of *R. geographicum* -Fig. 5.6- has a bipolar distribution; moreover each of the two lineages detected inside the species also showed bipolar pattern. Long-distance dispersion could be the most probable way to explain the current distribution.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el aumento en la temperatura global del planeta ha propiciado un extensivo retroceso glaciar (Braithwaite 2002; Bamber y Payne 2004), tanto en el Ártico como en el Antártico y en zonas alpinas de ambos hemisferios (Armstrong y Brodzik 2001; Meier *et al.* 2005; Goudie 2006; Rignot *et al.* 2011). La respuesta biológica inmediata al fenómeno del retroceso de los frentes glaciares es el inicio de la colonización biológica sobre las nuevas zonas disponibles, siendo los líquenes los principales colonizadores pioneros (Porter 1981; Innes 1986; Sancho *et al.* 2001; Winschester y Chaujar 2002).

R. geographicum s. lat. es uno de los líquenes más importantes en la colonización primaria en estas zonas utilizándose en estudios de retroceso glaciar y en la mayoría de los estudios de liquenometría (Porter 1981; Armstrong 1983; Armstrong y Smith 1987; Benedict 1988; Innes 1986; Sancho y Pintado 2004; Bradwell y Armstrong 2007; Sancho *et al.* 2007a; Zhu y Yu 2007; Jomelli *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2011). Su utilización se debe tanto a las distintas particularidades que los definen, e.g. tener tasas de crecimiento muy lentas relacionadas con las diferentes condiciones climáticas de cada lugar (Armstrong 1983; Sancho y Pintado 2004; Sancho *et al.* 2007a), como por tener una amplia distribución geográfica -bipolar y cosmopolita- (Runemark 1956a; Proctor 1983; Sancho y Valladares 1993; Winschester y Chaujar 2002) y por ser muy longevos (Armstrong 2004).

La plasticidad fenotípica³ es bien conocida en los hongos liquenizados (Nash *et al.* 1990; Pintado *et al.* 1997; Rikkinen 1997), estudiándose en líquenes con amplias distribuciones geográficas (Crespo *et al.* 2002; Lumbsch y Leavitt 2011; Pino-Bodas *et al.* 2011) incluso cosmopolitas (Galloway 2008). Es de primordial importancia constatar que *R. geographicum s. lat.* presente una amplísima distribución mundial lo que probaría el gran potencial adaptativo del grupo frente a condiciones micro-climáticas similares (Sancho *et al.* 2000; Green *et al.* 2008; Vivas 2012). Por tanto, se ha estudiado en este capítulo el análisis filogenético del grupo de *Rhizocarpon geographicum* a escala mundial con los siguientes objetivos:

³ Plasticidad fenotípica definida como la capacidad de un genotipo para expresar diferentes fenotipos como una respuesta a las condiciones ambientales.

-Reconstruir la filogenia del grupo y evaluar la consistencia de los dos linajes detectados en el Capítulo 2. La filogenia se contrastará con los 5 caracteres morfológicos más significativos según los resultados del Capítulo 2. Tales caracteres eran: diámetro del apotecio (DAp), número de células por ascóspora (CSp), longitud de las ascósporas (LgSp), anchura de las ascósporas (AnSp) y reacción positiva a la potasa del epihimeno (KOH).

-Evaluar la idoneidad de los caracteres enumerados como caracteres diagnósticos en el grupo.

-Analizar la diversidad molecular de los linajes detectados y de *R. geographicum* s. lat. en cada una de las estaciones prospectadas.

-Analizar los patrones biogeográficos de distribución y la bipolaridad del grupo en contraste con los resultados obtenidos en la filogenia.

En los estudios filogenéticos se usaron métodos moleculares, específicamente de los *loci* ITS nu y LSU mt, que fueron los utilizados en los análisis correlativos de los Capítulos 2, 3 y 4. Se realizaron análisis de tipo bayesiano y de máxima parsimonia combinando la información aportada por ambos marcadores. Así mismo se evaluó la importancia taxonómica de los caracteres morfológicos más significativos en contraste con los linajes filogenéticos detectados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Medio físico y material biológico

Se incluyeron un total de 152 individuos del grupo de *R. geographicum* procedentes de 14 áreas⁴ con una distribución mundial -Fig. 5.0 y 5.1-. De estos individuos 23 proceden de cuatro localidades de la Península Ibérica (PI), tal y como se indica en la Tabla 5.2. Dos de estas cuatro localidades (PI₁ y PI₂) fueron elegidas por contarse entre las más diversas en cuanto al número de “morfo-especies” detectadas incluyéndose al menos un individuo por “morfo-especie” y 10 individuos de cada localidad. Se completa el muestreo con PI₃₋₄₋₅ para abarcar así a todas las “morfo-especies” estudiadas en la PI. El resto de individuos (129 individuos) pertenecen a distintas localidades de 13 áreas distintas.

⁴ Se ha llamado “área” a las zonas geográficas amplias donde se realizaron los muestreos y localidad a los distintos puntos del área donde se recolectaron con diferencias en las coordenadas geográficas.

Para las especificaciones geográficas (coordenadas y altitud) y de recolección (localidad, fecha de recolección y recolector) son las dadas en las Tablas 2.1 y 2.2 del Capítulo 2 para los individuos de la Península Ibérica y el Apéndice 5 apartado A para los individuos del resto del mundo. Así mismo las abreviaturas para cada localidad y el binomen que se otorgó a cada individuo estudiado son los que allí se expresan.

Tabla 5.1.- Correspondencia de áreas geográficas con sus abreviaturas y las localidades incluidas.	
Área geográfica	Abreviatura_(Localidades incluidas)
Alaska	Al
Antártida Continental	AnC
Antártida Marítima	AnM _(1,2)
Chile	Ch _(1,2)
Escocia	Ec
Estados Unidos	EU ₍₁₋₂₎
India	I
Macaronesia	M ₍₁₋₄₎
México	Mx _(1,2)
Nueva Zelanda	Nz
Península Ibérica	PI ₍₁₋₅₎
Svalbard	Sv ₍₁₋₃₎
Taiwán	Tw _(1,2)
Tierra de Fuego	TF ₍₁₋₃₎

En el mapa de la Fig. 5.1 se indican las 14 áreas muestreadas y en algunos caso, por tratarse de localidades alejadas entre sí, se indican las localidades de dichas áreas: Península Ibérica 1 y 2 (PI₁ y PI₂), Estados Unidos 1 y 2 (EU₁ y EU₂) y Chile 1 y 2 (Ch₁ y Ch₂). El resto de localidades de cada área se tuvieron en cuenta para su contrastación con la filogenia según las abreviaturas dadas para cada localidad -Tabla 5.1-.



Figura 5.0.a.- Volcán Iztaccíhuatl. México.



Figura 5.0.b.- P. N Aigüestortes y Estany de Sant Maurici, España.

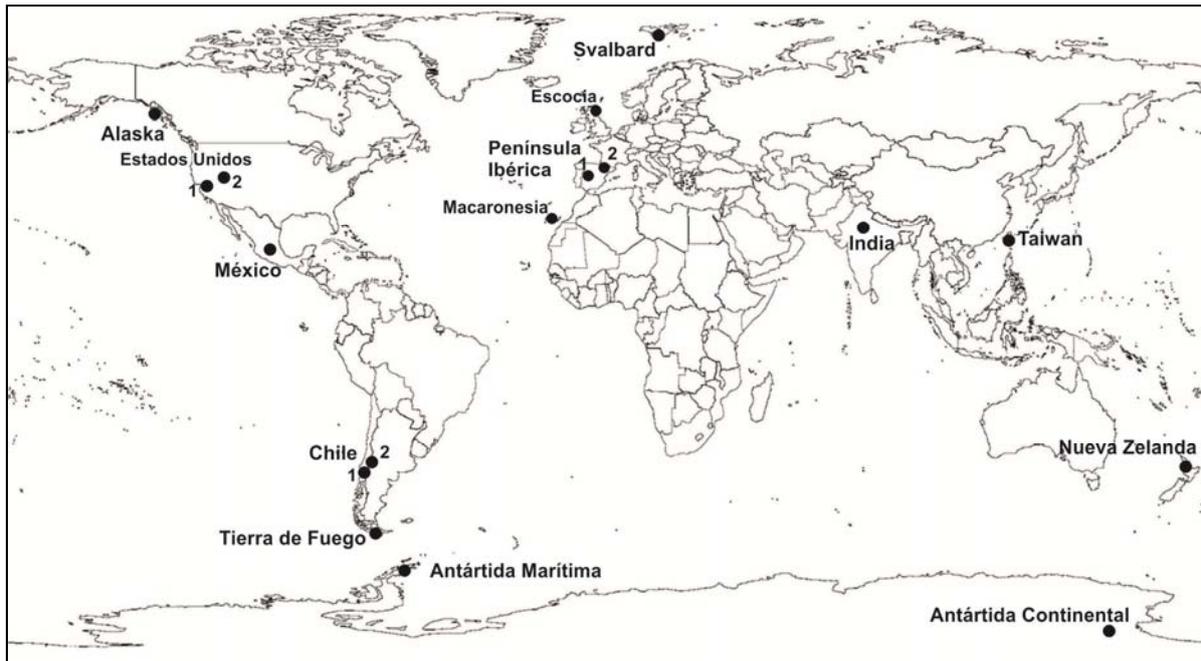


Figura 5.1.- Mapa de las áreas de recolección.

Tabla 5.2.- Localidad y Código de Herbario de los distintos individuos del grupo de *R. geographicum* de la Península Ibérica. Se indica la abreviatura para cada localidad utilizada en los distintos análisis, su correspondencia con las localidades del Capítulo 2 y el número de individuos incluidos

**Abreviatura por Loc./ Loc. Cód. Herbario / “Morfo-especie” del grupo
Capítulo 2/ N° Indv.**

PI ₁ / Gredos (G)/ 10	MAF-16654 / <i>R. tinei</i>
	MAF-16655 / <i>R. sublucidum</i>
	MAF-16656 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>
	MAF-16658 / <i>R. tavaresii</i>
	MAF-16662 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
	MAF-16663 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i>
	MAF-16664 / <i>R. sphaerosporum</i>
	MAF-16666 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
	MAF-16668 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
	MAF-16670 / <i>R. lecanorinum</i>
PI ₂ / Pirineos (Pi)/ 10	MAF-16717 / <i>R. tinei</i>
	MAF-16719 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>
	MAF-16720 / <i>R. sphaerosporum</i>
	MAF-16721 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
	MAF-16722 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
	MAF-16723 / <i>R. macrosporum</i>
	MAF-16725 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>
	MAF-16726 / <i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i>
	MAF-16727 / <i>R. tavaresii</i>
MAF-16728 / <i>R. sphaerosporum</i>	
PI ₃ / La Najarra (N)/ 1	MAF-16636 / <i>R. riparium</i> subsp. <i>riparium</i>
PI ₄ / Las Batuecas (Ba)/ 1	MAF-16651 / <i>R. drepanodes</i>
PI ₅ / Huesca (Hu)/ 1	MAF-16714 / <i>R. saanaënse</i>

Observaciones anatómicas e identificación de las “morfo-especies”

Igual que se hizo en el Capítulo 2 las referencias principales para la identificación fueron la monografía de Runemark (1956a) y la clave resumen para el subgénero *Rhizocarpon* de Poelt (1988). Como ocurría con las muestras de la Península Ibérica, en muchos casos, los especímenes identificados no se ajustan completamente a las descripción de las especies dadas en estos trabajos, por lo que la decisión para atribuir un determinado binomen se ha basado en el conjunto de los caracteres descritos en dichos trabajos más que en uno sólo de ellos; no obstante se dio más peso a los caracteres relacionados con los ascocarpos: química y diámetro del apotecio y caracterización de las ascósporas.

Para las observaciones anatómicas y toma de datos se tuvieron en cuenta únicamente los 5 caracteres anatómicos significativos según los resultados del Capítulo 2 (Tablas 2.7 y 2.9, Fig. 2.8), estos fueron: diámetro del apotecio (DAp); número de células por espora (CSp); longitud de las esporas (LgSp); anchura de las esporas (AnSp) y reacción a la potasa del epihimenio (KOH). La reacción al I + de la médula se realizó en todos los casos comprobando así la presencia de ácido rhizocárpico, carácter común a todos los individuos del grupo de *R. geographicum* (Runemark 1956a; Poelt 1988; Introducción general y Capítulo 2).

Las especificaciones metodológicas para la toma de datos anatómicos e identificación de las “morfo-especies” fueron las mismas que las utilizadas en el Capítulo 2, por lo que no se repetirán aquí (ver Tabla 2.4). Se tuvo en cuenta las medias para los 5 caracteres anatómicos estudiados y además los valores mínimos y máximos para las medidas tomadas para la caracterización de las ascósporas.

Secuenciación de ADN y análisis filogenético

Se ha secuenciado el ADN del micobionte para los 129 individuos del grupo de *R. geographicum* (Apéndice 5 apartado A) con distribución mundial. Las condiciones de extracción, amplificación y secuenciación así como la revisión de las secuencias obtenidas y los alineamientos fueron realizados según se detallan en la Metodología General. Se incluyeron además 23 individuos del grupo procedentes de la Península Ibérica, incluyéndose un total de 152 individuos del grupo de *R. geographicum*.

También se tuvieron en cuenta las secuencias de 12 individuos pertenecientes a los grupos *Alpicola*, *Superficiale* y *Viridiatrum* con el fin fijar correctamente las posibles relaciones filogenéticas con el grupo de *R. geographicum* (Tabla 5.3) y un individuo de *R. adarense* (Darb.) I.M. Lamb. Para las especificaciones geográficas y de recolección de estos individuos se recomienda revisar el Apéndice 5 apartado A y la Tabla 2.1 del Capítulo 2.

En todos los casos se utilizaron los *primers* correspondientes a la región ITS nu y LSU mt. Se recomienda revisar la Metodología general: la Tabla 3 para las especificaciones de las condiciones de PCR para ambos *loci*, las especificaciones para la revisión y alineamiento de las secuencias obtenidas, y la Tabla 5 para los grupos externos utilizados en los análisis filogenéticos.

Tabla 5.3- Especies y Subespecies de otros grupos del subgénero <i>Rhizocarpon</i> incluidos.	
Especies [Localidad]	Cód. Herbario
<i>R. adarense</i> [AnC]	MAF-17700
Grupo <i>Superficiale</i> :	
<i>R. dispersum</i> [EU ₂]	MAF-17646
	MAF-17648
<i>R. effiguratum</i> [SN]	MAF-16674
<i>R. pussillum</i> [Pñ]	MAF 16674
<i>R. superficiale</i> subsp. <i>boreale</i> [TF ₂]	MAF-17677
<i>R. superficiale</i> subsp. <i>superficiale</i> [SN]	MAF-16682
Grupo <i>Alpicola</i> :	
<i>Rhizocarpon alpicola</i> [N]	MAF-16637
	MAF-16648
<i>R. inarense</i> [SV ₃]	MAF-17614
Grupo <i>Viridiatrum</i> :	
<i>R. subtile</i> [CG]	MAF-17049
<i>R. viridiatrum</i> [CG]	MAF-17048

El análisis bayesiano (MC)³ se realizó asumiendo el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica GTR+ I+ G (*General Time Reversible*) (Rodríguez *et al.* 1990), teniendo en cuenta la distribución de cambios entre las bases nitrogenadas, la partición de cada región como independiente una de otra, y se corrió un total de 5 *runs* paralelos, 8 millones de generaciones y 10 cadenas. Cada 1000 árboles muestreados, un árbol fue salvado en un archivo generado por el programa, eliminando los 3.500 primeros árboles como *burn-in*.

El análisis de MP se llevó a cabo siguiendo las especificaciones detalladas en la sección correspondiente de la Metodología General.

Estadística descriptiva y t-Student de los caracteres morfológicos

Para los cuatro caracteres anatómicos estudiados con carácter cuantitativo; diámetro del apotecio (DAp); número de células por ascóspora (CSp); longitud de las ascósporas (LgSp) y anchura de las ascósporas (AnSp), se realizaron análisis estadísticos descriptivos de las variables estableciendo la media, los mínimos y máximos usando el programa Excel v. 2010 e ilustrándose con el programa Statgraphics Plus v. 4.1, con el que se calculó el p-valor correspondiente al análisis de la t-Student, considerando a este significativo con valores ≤ 0.05 , y se crearon los gráficos *box-plots* correspondientes para cada carácter anatómico en los que se ilustra la media, el mínimo y el máximo, la desviación estándar (SD) y la mediana de las medias del total de mediciones realizadas para cada carácter.

Los cinco caracteres anatómicos y el carácter químico reacción positiva a la potasa del epihimeno (KOH) se compararon con la topología del árbol filogenético, estableciéndose rangos concretos de las medidas tomadas para los cuatro caracteres anatómicos, como se indica en la Tabla 5.4. Para comparar la reacción a la KOH se tuvo en cuenta si reaccionaban o no al compuesto.

Tabla 5.4- Rango de las medidas tomadas para los caracteres anatómicos estudiados.				
	DAp	CSp	LgSp	AnSp
Pequeño	< 601 μm	≤ 16	$\leq 31 \mu\text{m}$	$\leq 16 \mu\text{m}$
Grande	$\geq 601 \mu\text{m}$	> 16	$> 31 \mu\text{m}$	$> 16 \mu\text{m}$

Para todos los caracteres se calcularon porcentajes de aparición, teniendo en cuenta los rangos dados para DAp, Csp, LgSp, AnSp y la reacción positiva o no a la KOH.

Estudio comparativo del material propio con las especies tipo

La revisión y estudio de las especie tipo se realizó en el Capítulo 1. Para la comparación de las especies tipo frente con nuestras muestras se tuvieron en cuenta únicamente las observaciones relacionadas para las ascósporas: número de células por ascóspora (CSp); longitud de las ascósporas (LgSp) y anchura de las ascósporas (AnSp). Para estos caracteres se establecieron los mismos rangos que para las medidas tomadas de las observaciones realizadas en el material propio para dichos caracteres-Tabla 5.4-.

Patrones de distribución biogeográfica, diversidad molecular y estructura genética

Utilizando como base los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos se realizaron diferentes análisis con respecto a la distribución biogeográfica del grupo de *R. geographicum*:

-Mapa de distribución biogeográfica de los linajes: se elaboró un mapa a escala mundial sobre el que se dibujaron diagramas con la frecuencia de aparición de cada linaje detectado en los análisis de filogenia por área muestreada.

-Diversidad molecular de las áreas geográficas estudiadas y de los linajes detectados: utilizando el programa DNASP v.5 (Librado y Rozas 2009), en el que se introdujeron las secuencias para cada *loci* estudiado por separado; se excluyeron las zonas ambiguas (con Ns) y tuvieron en cuenta los *gaps* como un carácter más. De este análisis se obtuvieron valores para los polimorfismos de ADN (S), el valor de π (número de mutaciones por secuencia, i.e., diversidad de nucleótidos, Nei 1987), valores de H_d (diversidad de haplotipos, Nei 1987) y número de haplotipos por área estudiada. Valores de π cercanos a 1 indica que comparativamente las mutaciones por secuencia son elevadas habría muchos nucleótidos muy distintos por posición, mientras que valores cercanos a 0 indican que las mutaciones por secuencia son bajas. H_d con valores iguales a 1 indican que cada secuencia es un haplotipo diferente e iguales a 0 indican la presencia de un único haplotipo.

En ambos casos sólo se tuvieron en cuenta las áreas geográficas con más de 5 individuos en el muestreo, excluyendo así el área de $EU_{(1-2)}$ por incluir solamente 3 individuos.

RESULTADOS

Análisis filogenético

Se han generado un total de 258 secuencias nuevas (129 secuencias del total de la región de ITS nu y 129 secuencias parciales del marcador LSU mt) de los 129 individuos del grupo de *R. geographicum* con distribución mundial, analizados junto con 46 secuencias (23 secuencias totales de la región de ITS nu y 23 secuencias parciales del marcador LSU mt) de individuos del grupo procedentes de la Península Ibérica generadas en el Capítulo 2.

Además se obtuvieron 10 secuencias nuevas de sendos *loci* para los individuos de *R. adarense* y de las especies y subespecies de los grupos *Alpicola* y *Supeficiale* incluidos y analizados conjuntamente con las secuencias generadas en el Capítulo 2 para individuos del grupo *Supeficiale* y *Viridiatrum* -Tabla 5.3-. Se obtuvo un alineamiento final de una longitud total de 497 pb para el ITS nu y 388 pb para el LSU mt.

El árbol consenso 50% *Majority Rule* obtenido a partir de 36500 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ -Fig. 5.2- se generó a partir de dos matrices independientes: Una matriz de 497 caracteres de los cuales 253 son informativos para la región del ITS nu, y una matriz de 388 caracteres de los cuales 68 son informativos para la región LSU mt. Se obtuvo una matriz general de 885 caracteres de los cuales 321 eran informativos. Para los valores de los parámetros de probabilidad se recomienda revisar el Apéndice 5 apartado C.

El análisis de MP se consideran 490 caracteres constantes, 313 como caracteres parsimónicamente informativos y 82 caracteres variables fueron parsimónicamente no informativos.

En el árbol filogenético obtenido se observan patrones filogenéticos muy similares a al árbol filogenético obtenido en el Capítulo 2 -Fig. 2.2 y 2.3.

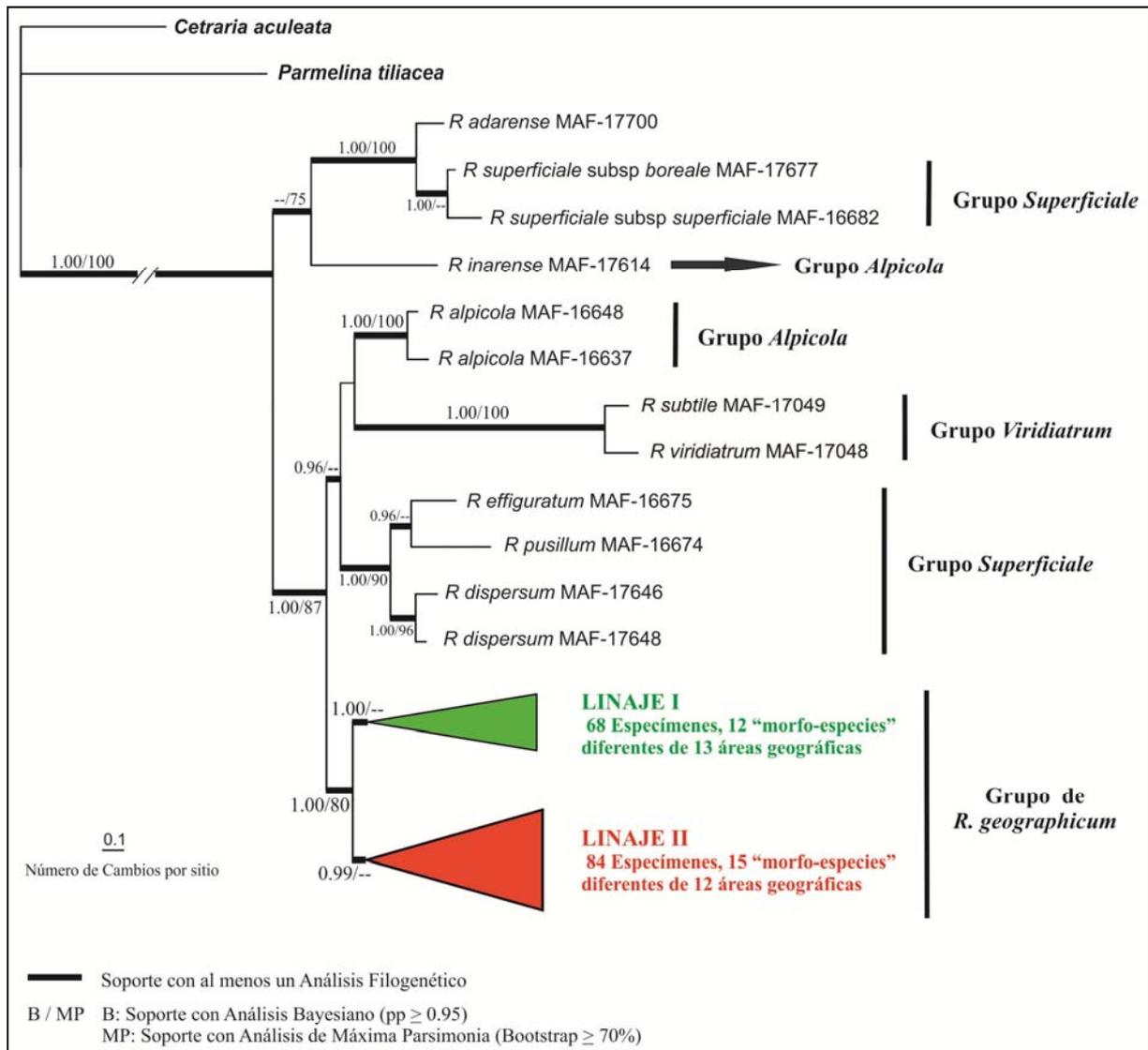


Figura 5.2.- Árbol Filogenético del grupo de *R. geographicum*. Árbol 50% *Majority Rule* a partir de 36500 árboles muestreados con análisis Bayesiano (MC)³ de las regiones ITS nu y LSU mt. Linaje I en verde y Linaje II en rojo.

En el clado del grupo de *R. geographicum* se encuentran todos los individuos del grupo estudiados, distribuidos en dos linajes evolutivos, el **Linaje I** y el **Linaje II**, homólogos a los linajes de mismo nombre detectados en los análisis realizados en el Capítulo 2:

El **LINAJE I** comprende 68 individuos pertenecientes a 13 áreas geográficas con una distribución bipolar; AnC, AnM, Al, Ch, Ec, EU, M, Mx, Nz, PI, Sv, TF y Tw, a los que se otorgó el binomen correspondiente a 12 “morfo-especies”:

- R. geographicum* subsp. *arcticum*
- R. geographicum* subsp. *diabasicum*
- R. geographicum* subsp. *frigidum*
- R. geographicum* subsp. *geographicum*
- R. geographicum* subsp. *prospectans*
- R. lecanorinum*
- R. nidificum*
- R. macrosporum*
- R. riparium* subsp. *lindsayanum*
- R. tavaresii*
- R. sublucidum*
- R. tinei*

El **LINAJE II** comprende 84 individuos pertenecientes a 12 áreas geográficas, presentando también una distribución bipolar; AnM, Al, Ch, EU, I, M, Mx, Nz, PI, TF, Tw y Sv a los que se otorgó el binomen correspondiente a 15 “morfo-especies”:

- R. drepanodes*
- R. ferax*
- R. geographicum* subsp. *arcticum*
- R. geographicum* subsp. *diabasicum*
- R. geographicum* subsp. *frigidum*
- R. geographicum* subsp. *geographicum*
- R. lecanorinum*
- R. macrosporum*
- R. riparium* subsp. *lindsayanum*
- R. riparium* subsp. *riparium*
- R. saanaëense*
- R. sphaerosporum*
- R. sublucidum*
- R. tavaresii*
- R. tinei*

En general el Linaje II es más diverso que el Linaje I con respecto al número de “morfo-especies” de *R. geographicum* s. lat. que agrupa (15 “morfo-especies”), mientras que el Linaje I sería el más diverso con respecto a la geografía (13 áreas geográficas), y en ambos encontramos una distribución bipolar.

Análisis de los caracteres anatómicos

-Análisis contrastado de los caracteres anatómicos con la topología de los árboles filogenéticos: Se obtuvieron un total de 1672 medidas, que son las medias aritméticas, mínimos y máximos de 3496 medidas de los 4 caracteres anatómicos cuantitativos y de la observación del carácter anatómico-químico cualitativo reacción positiva a la potasa del epihimnio de los 152 individuos del grupo *R. geographicum* estudiados. En las Tablas B.1.a y b del Apéndice 5 se proporcionan el total de las medidas de los diferentes caracteres anatómico-químicos estudiados en el mismo orden en el que aparece cada individuo en el árbol filogenético -Fig. 5.3.a y b-.

Según los rangos para las medidas de cada carácter -Tabla 5.4- los caracteres se contrastaron con el árbol filogenético. Los individuos aparecen en los árboles filogenéticos para cada linaje con el binomen otorgado según las “morfo-especies” clásicas (Runemark 1956a; Poelt 1988) junto con el número de inclusión en el herbario MAF y entre paréntesis la abreviatura de la localidad geográfica donde fueron recolectados según la Tabla 5.1 -Fig. 5.3.a y b-.

Los caracteres asociados con las ascósporas podrían ser descriptivos: el Linaje I comprendería individuos con ascósporas mayoritariamente pequeñas mientras que los individuos del Linaje II parecen tener ascósporas más grandes. Con respecto al diámetro del apotecio ambos linajes contienen en general apotecios grandes no pudiéndose diferenciar valores entre uno y otro linaje. Por otro lado, la reacción positiva a la KOH en el epihimnio parece más común en el Linaje I.

En ambos linajes vemos como las distintas localidades geográficas se distribuyen a lo largo de ambos linajes, sólo en clados pequeños encontraríamos agrupaciones por áreas o localidades geográficas cercanas, mientras en otros clados aparecen individuos de zonas tan lejanas como Nz junto con Al o Mx y PI junto con Tw.

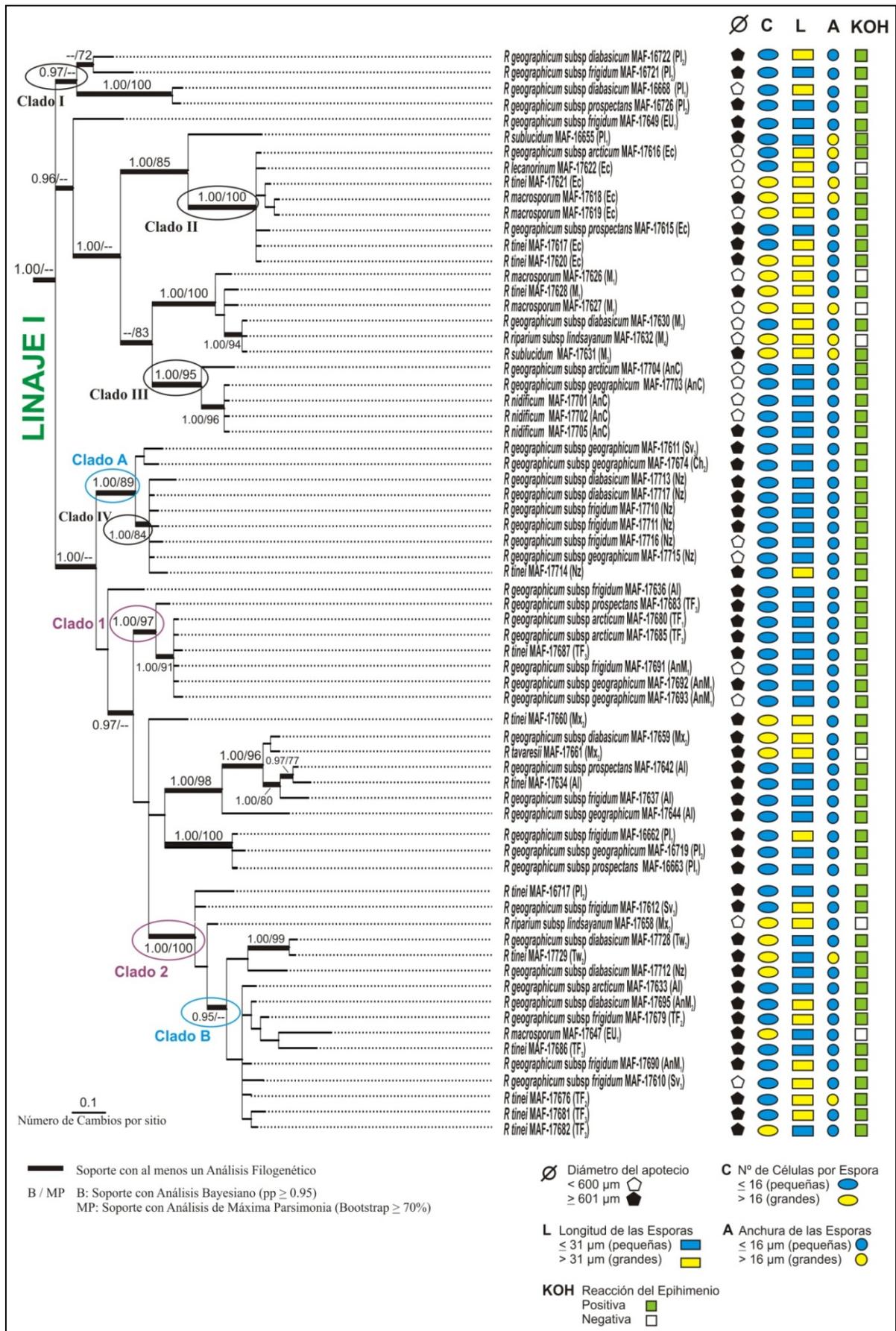


Figura 5.3.a.- Árbol Filogenético del Linaje I del grupo de *R. geographicum*. Comparativa de los 5 caracteres anatómico-químicos estudiados para cada individuo. Árbol 50% *Majority Rule* a partir de 36500 árboles muestreados con análisis bayesiano (MC)³ de la regiones ITS nu y LSU mt. Biogeografía: clados marcados con una elipse.

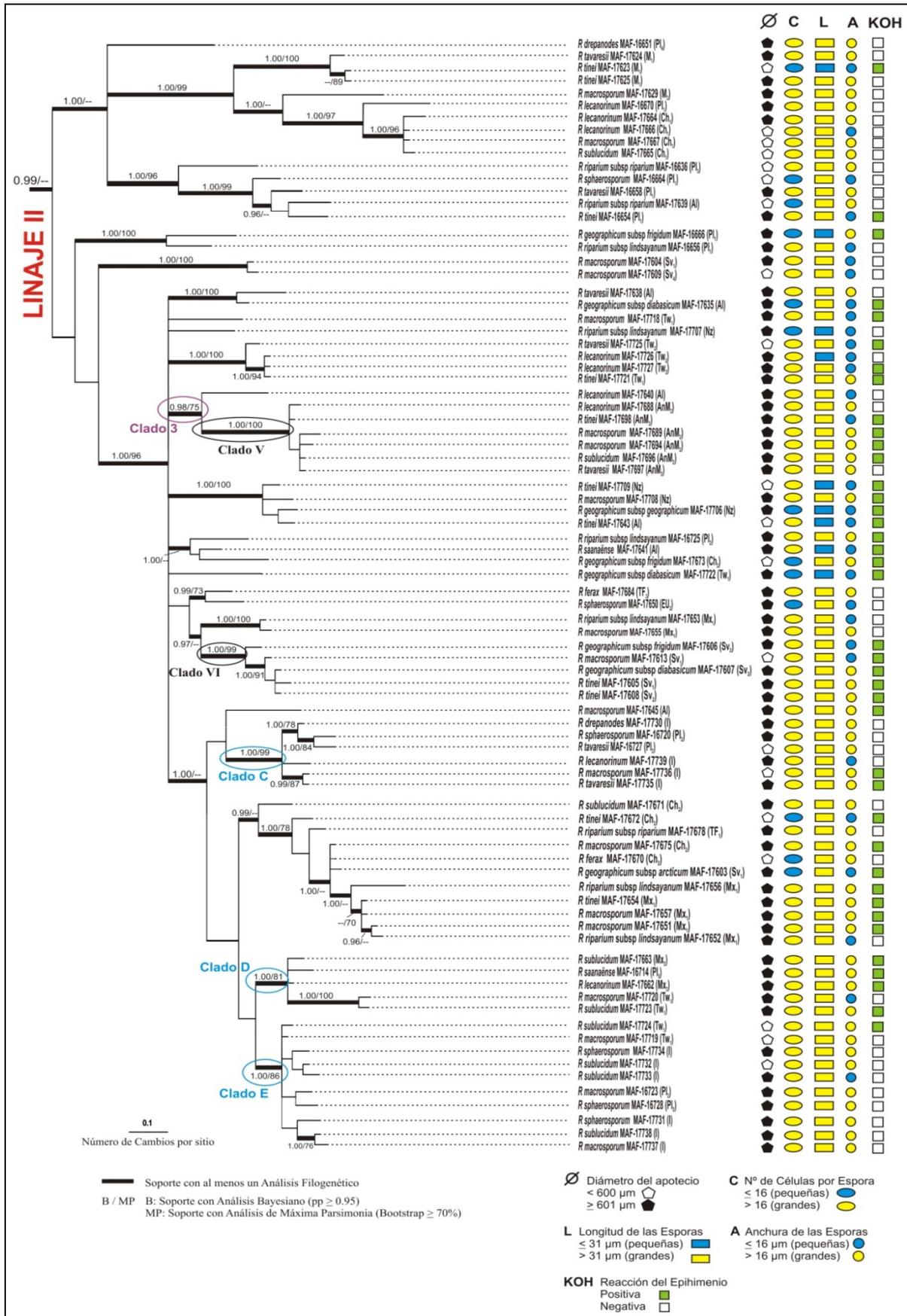


Figura 5.3.b.- Árbol Filogenético del Linaje II del grupo de *R. geographicum*. Comparativa de los 5 caracteres anatómico-químicos estudiados para cada individuo. Árbol 50% *Majority Rule* a partir de 36500 árboles muestreados con análisis bayesiano (MC)³ de la regiones ITS nu y LSU mt. Biogeografía: clados marcados con una elipse.

-Estadística descriptiva de los caracteres anatómico-químicos: Teniendo en cuenta los porcentajes de presencia por encima del 70% -Tabla 5.5-, los caracteres que mejor definen a ambos linajes son las medidas relacionadas con las ascósporas, siendo en general más pequeñas en el Linaje I (CSp= 73,5%, AnSp= 86,8%) que en el Linaje II que contendría esporas más grandes (CSp= 84,5%, LgSp= 89,3%). La reacción KOH+ del epihimeno aparece en el Linaje I en un 91,2% de los individuos, tan sólo 6 de ellos dieron reacción negativa, sin embargo en el Linaje II los individuos con reacción positiva aparecen en porcentaje muy similar a la negativa. Por otro lado el DAp se muestra en sendos linajes como grande con porcentajes por encima del 70% en ambos.

Tabla 5.5- Porcentajes de aparición de los caracteres anatómico y químico estudiados por linaje. Se dan según los rangos fijados para cada carácter anatómico (P= pequeño, G=grande) o la reacción KOH+ del epihimeno. En negrita se indican los porcentajes de aparición superiores al 70%.

	DAp		CSp		LgSp		AnSp		KOH+
	P	G	P	G	P	G	P	G	
LINAJE I	27.9%	72.1%	73.5%	26.5%	58.8%	41.2%	86.8%	13.2%	91.2%
LINAJE II	23.8%	76.2%	15.5	84.5%	10.7%	89.3%	35.7%	64.3%	47.6%

-Análisis estadístico de la t-Student: los caracteres directamente relacionados con las ascósporas (CSp, LgSp y AnSp) dieron todos valores por debajo del p-valor ≤ 0.05 , i.e. son significativos para ambos linajes, mientras que el carácter DAp no fue significativo -Tabla 5.6 y Fig. 5.4-.

		Media	SD	Mediana	Mínimo	Máximo	p-valor	t-Student
DAp	Linaje I	711,48	236,09	732,59	112,98	1351,92	0,66	0,43
	Linajell	697,17	164,86	680,31	289,23	1093,64		
CSp	Linaje I	12,67	4,78	12,16	3,5	30,3333	< 0,0001	-10,03
	Linajell	21,05	5,36	20,41	10,333	34,6		
LgSp	Linaje I	29,85	4,9	30,07	17,388	43,616	< 0,0001	-8,06
	Linajell	36,56	5,26	35,91	25,803	48,6967		
AnSp	Linaje I	14,32	1,95	14,16	10,56	21,0133	< 0,0001	-7,57
	Linajell	16,94	2,25	17,16	12,423	22,692		

Tabla 5.6- Media, desviación estándar (SD), mediana, mínimos, máximos y valores de probabilidad (p-valor) para el análisis estadístico de t-Student de los caracteres anatómicos cuantitativos. En negrita se indican los valores con p-valor significativos para la t-Student (p-valor ≤ 0.05).

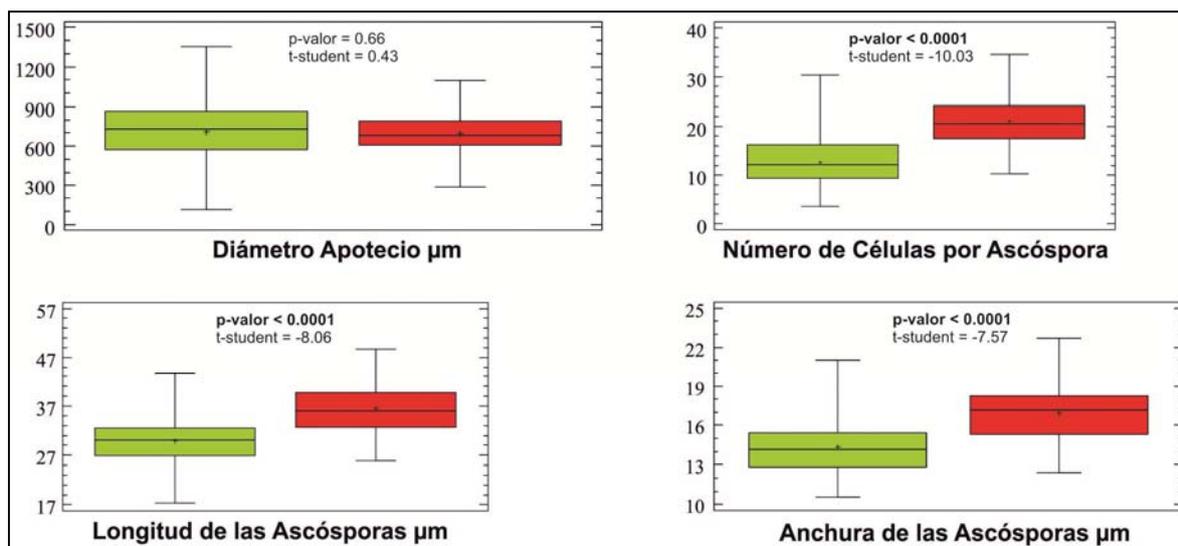


Figura 5.4.- Box-plots que reflejan la variabilidad de los caracteres cuantitativos dentro de cada linaje - Linaje I en verde y Linaje II en Rojo-. La distribución de los datos esta expresada en medias \pm la desviación estándar (Media: +, SD: cajas, Mediana: línea longitudinal dentro de la caja), los extremos (\pm) expresan el máximo y el mínimo de las medidas tomadas.

Estudio de las especies tipo: comparación entre filogenia y caracteres anatómicos

Tras los resultados obtenidos en los que se comprobó que los caracteres más relevantes y significativos eran los relacionados con las ascósporas, se tuvieron en cuenta estas medidas para la comparación de las especies tipo con la filogenia y los materiales propios. Se obtuvieron un total de 126 medidas, que son las medias aritméticas, mínimos y máximos de más de 160 medidas tomadas para la caracterización de las ascósporas de los 14 especímenes tipo revisados -Tabla 5.7-. Se recomienda revisar la Tabla 1.2 del Capítulo 1.

Especie	Nº Herbario	CSp			LgSp			AnSp		
		med	min	max	med	min	max	med	min	max
<i>R. dibasicum</i>	H-9502464	13	12	14	26,9	20	35	14,8	10	17,4
<i>R. drepanodes</i>	M-0024019	32	30	34	40,8	28	54	18,3	15	25
<i>R. ferax</i>	L-108361	16,8	14	18	34,4	25	41,2	13,2	12,3	14,4
<i>R. frigidum</i>	L-587	10	10	10	27,6	21	33	12,6	11	15
<i>R. lecanorinum</i>	P-160822	31	28	36	44,6	40,4	53,5	20,5	15,9	28,2
<i>R. lindsayanum</i>	H-9502545	15	12	22	42,7	36	53	18,2	16	21
<i>R. macrosporum</i>	L-069173	30,7	28	34	46,6	42	53,9	19,1	18,8	19,4
<i>R. prospectans</i>	H-9502588	15,3	14	16	36,7	35,7	37,6	13,4	12,9	14,5
<i>R. riparium</i>	H-9502857	14	12	16	37,5	26	43,2	18,9	13	22,1
<i>R. saanaense</i>	H-9502520	16	14	18	41,5	38,8	45,8	18,5	17,8	19,3
<i>R. sphaerosporum</i>	L-571	26,3	25	28	41,5	35	45,3	18,7	17	20,7
<i>R. sublucidum</i>	H-9502642	38	36	40	51,8	48,2	56,1	22	20,4	23,2
<i>R. tavaresii</i>	H-9502640	18,7	18	20	34,8	25	40	18,4	13	22,5
<i>R. tienei</i> subsp <i>arcticum</i>	L-582559	11,3	10	12	31,4	30,5	33,2	17,9	17	19,5

Tabla 5.7.- Observaciones realizadas en la revisión de las especies tipo de los caracteres anatómicos relacionados con las ascósporas. Número de células por espora (CSp), Longitud de las esporas (LgSp), Anchura de las esporas (AnSp).

La comparación con la filogenia del grupo se realizó teniendo en cuenta los rangos para las medidas de las ascósporas dados en la Tabla 5.4, incluyéndose los especímenes tipo en uno u otro linaje, teniéndose en cuenta que el Linaje I responde a rangos pequeños de las ascósporas y el Linaje II a rangos grandes, en líneas generales y según los resultados obtenidos. Cuando no ha habido confluencia entre las tres propiedades de las ascósporas medidas se dio prioridad al carácter CSp por ser el más constante en ambos linajes.

Las especies tipo de *R. diabasicum*, *R. frigidum*, *R. prospectans*, *R. riparium* y *R. tinei* subsp. *arcticum* pertenecerían al Linaje I, mientras que *R. drepanodes*, *R. ferax*, *R. lecanorinum*, *R. lindsayanum*, *R. macrosporum*, *R. saanaënse*, *R. sphaerosporum*, *R. sublucidum* y *R. tavaresii* se ubicarían en el Linaje II.

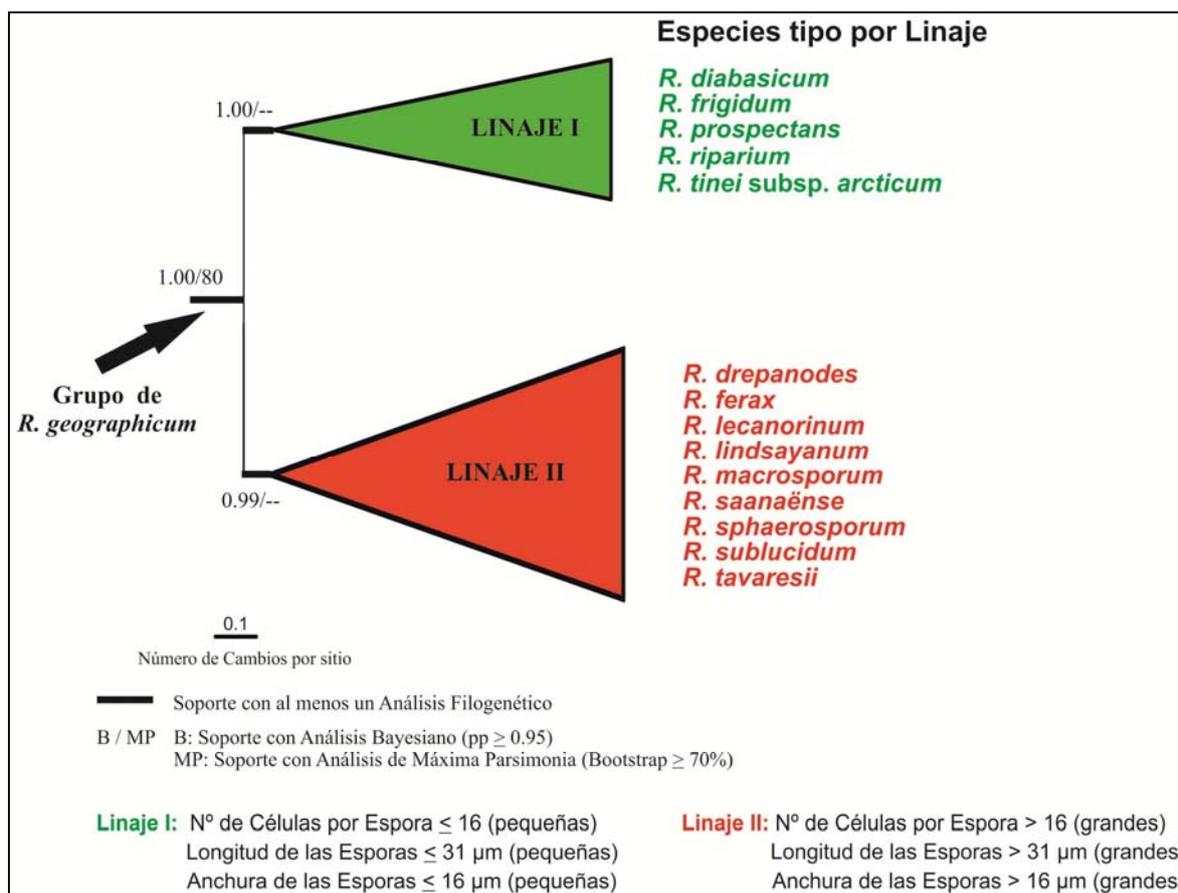


Figura 5.5.- Especies tipo localizadas por linaje dentro del grupo *R. geographicum* en base a la caracterización de sus ascósporas.

Patrones de distribución biogeográfica, diversidad molecular y estructura genética

-Mapa de distribución biogeográfica de los linajes: Con los dos linajes detectados en la Fig. 5.2 se ha construido un mapa en el que se representa la diversidad filogenética del micobionte -Linaje I y II- y su distribución a escala mundial, detectada en cada una de las 13 áreas estudiadas -Fig. 5.6-. Así EU como tal área fue excluido por el escaso número de muestras disponible; estas escasas muestras pertenecían a los dos linajes. A cada linaje se le dio un color diferente en los gráficos como se ha realizado en figuras anteriores: Linaje I verde y Linaje II rojo. Así, en Escocia (Ec) y en la Antártida Continental (AnC) encontramos solamente el Linaje I, mientras que en la India es el Linaje II el único que aparece. En el resto de zonas estudiadas aparecen ambos linajes en mayor o menor medida.

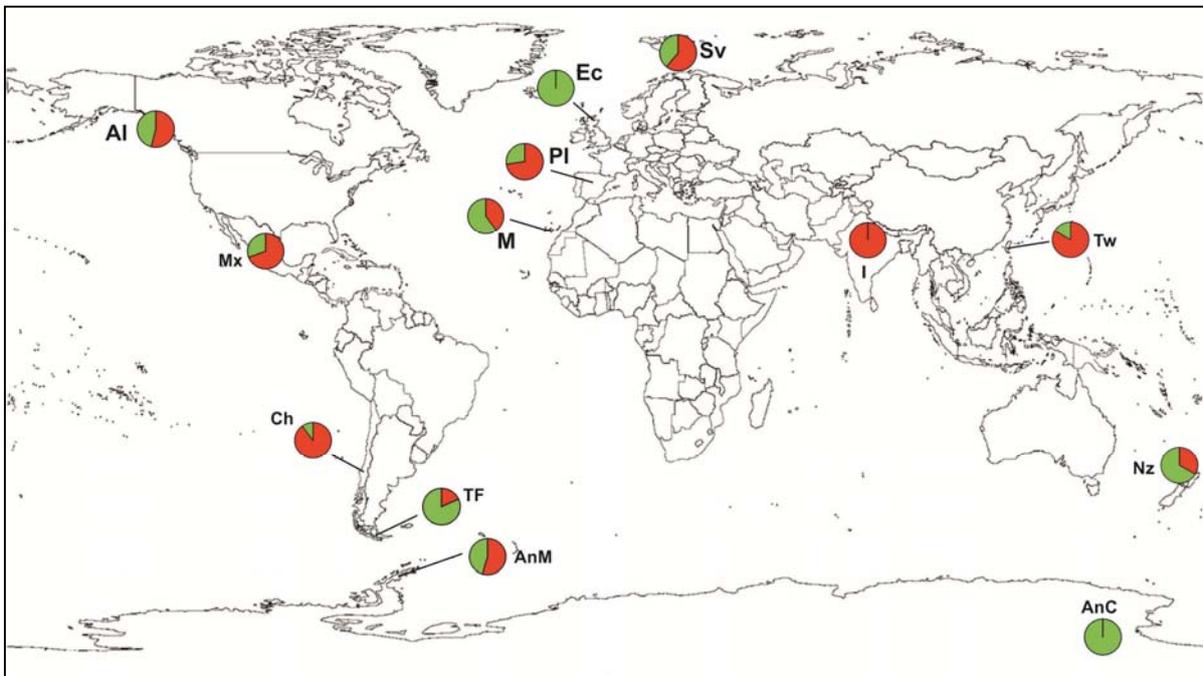


Figura 5.6.- Mapa de diversidad y distribución geográfica de los linajes de micobionte del grupo de *R. geographicum*. Según los linajes detectados en la Fig. 5.2: Linaje I en verde y Linaje II en rojo.

-Diversidad molecular de las áreas geográficas estudiadas y de los linajes detectados:

En la Tabla 5.8 se muestran los resultados de los análisis de diversidad genética por área geográfica muestreada y para cada uno de los *loci* analizados. La región ITS no parece ser más diversa genéticamente que la región LSU mt ya que en la mayoría de las localidades esta región tiene mayor número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (h), diversidad de haplotipos (Hd), y diversidad nucleotídica (π) por número de sitios analizados.

En general el Linaje II contiene mayor diversidad genética que el Linaje I, con valores mayores de S y h y ligeramente mayores de Hd y π para ambos *loci*, a excepción del valor de Hd del Linaje I que sería una centésima mayor.

Las áreas con mayor diversidad genética atendiendo a los valores más elevados de S, h y Hd serían para la región ITS nu; Al, AnM, M, Nz, PI, Sv y TF, mientras que para la región LSU mt las áreas más diversas serían; Al, Ch, Mx, PI, TF y Tw.

Los valores de π son en general muy pequeños tanto dentro de los linajes como en cada zona estudiada, indicando que la diversidad nucleotídica no es muy elevada dentro del grupo de *R. geographicum* para los *loci* estudiados.

Tabla 5.8.- Valores de diversidad genética del micobionte para cada *loci* estudiado (ITS nu y LSU mt). Se dan los valores de diversidad por localidad estudiada y por *loci*: primera línea ITS nu, segunda línea LSU mt. Se dan los valores también por linaje detectado y para el conjunto de datos. n; número de individuos estudiados, h; número de haplotipos encontrados, Hd; diversidad de haplotipos, π ; diversidad nucleotídica.

Área geográfica (contiene todas sus loc.)	Polimorfismos de ADN detectados		N	h	Hd	π
	Nº sitios analizados	Sitios Polimórficos (S)				
Al	497	119	13	13	1.00	0.07
	388	16	13	10	0.94	0.01
AnC	497	10	5	2	0.40	0.008
	387	0	5	1	0.00	0.000
AnM _(1,2)	471	46	11	8	0.92	0.046
	388	7	10	5	0.80	0.006
Ch _(1,2)	497	84	10	7	0.91	0.07
	388	8	10	7	0.91	0.007
Ec	497	5	8	5	0.85	0.003
	388	0	8	1	0.00	0.000
I	444	25	10	8	0.95	0.02
	388	4	10	3	0.62	0.004
M ₍₁₋₄₎	497	73	10	8	0.95	0.06
	388	8	10	5	0.75	0.006
Mx _(1,2)	497	80	13	9	0.91	0.06
	388	12	13	9	0.91	0.006
Nz	495	77	12	11	0.98	0.05
	388	9	12	5	0.66	0.004
PI ₍₁₋₅₎	497	152	23	21	0.98	0.08
	386	18	23	17	0.96	0.01
Sv ₍₁₋₃₎	497	86	11	9	0.96	0.06
	388	8	11	6	0.80	0.007
Tw _(1,2)	495	76	12	7	0.90	0.05
	388	13	12	6	0.86	0.014
TF ₍₁₋₃₎	496	62	11	10	0.98	0.04
	388	9	11	6	0.87	0.007
Linaje I	479	142	68	47	0.98	0.05
	388	19	68	28	0.93	0.01
Linaje II	444	181	84	63	0.99	0.06
	386	30	83	33	0.92	0.01
Total muestreo:	434	208	152	104	0.99	0.07
	386	34	151	43	0.93	0.01

DISCUSIÓN

Análisis filogenético

En los resultados obtenidos -Fig. 5.2- se aprecia que el subgénero *Rhizocarpon* podría resultar polifilético en su circunscripción actual (Runemark 1956a; Thomson 1967; Hafellner 1984): a escala global el comportamiento del subgénero parece ser el mismo que a escala más local como se comprobó en el estudio reflejado en el Capítulo 2 -Fig. 2.2, 2.3-. Así, individuos de *R. superficiale* subsp. *superficiale*, *R. superficiale* subsp. *boreale* ambos ubicados en el grupo *Superficiale* y *R. inarense*, del grupo *Alpicola*, aparecen formando un grupo hermano del clado que podría circunscribir al subgénero *Rhizocarpon*.

El resto de individuos de los grupos *Alpicola* y *Superficiale* y los dos individuos del grupo *Viridiatrum* incluidos en la filogenia, se encuentran formando un clado hermano del grupo de *R. geographicum* -Fig. 5.2-, en el que además se encuentran dos linajes, Linaje I y Linaje II, homólogos a los detectados en el Capítulo 2, confirmando así la misma topología filogenética que había sido inferida en el estudio parcial de la Península Ibérica.

La amplitud de nuestro estudio no permite discutir las relaciones de los grupos o linajes que integran el subgénero *Rhizocarpon*. En relación con los cuatro grupos tradicionales (Runemark 1956a; Thomson 1967; Poelt 1988): *Alpicola*, *Superficiale*, *Viridiatrum* y el de *R. geographicum*. Nuestros resultados no permiten más que insinuar que los grupos *Alpicola* y *Superficiale* no estarían bien definidos (Clayden 2004). Y la escasa representación de especies del grupo *Viridiatrum* no permite en absoluto apreciar su encuadre filogenético.

Como ya se indicó en el Capítulo 2, sería aconsejable una revisión en profundidad centrada en el rango genérico (Ihlen y Ekman 2002; Clayden 2004).

Comportamiento filogenético de las “morfo-especies”

Las “morfo-especies” muestran patrones polifiléticos comparables a los que se detectaron en los resultados del Capítulo 2. El concepto fenotípico de las especies del grupo no es respaldado por la filogenia, no existe correspondencia entre las “morfo-especies” y los linajes evolutivos, ni si quiera en linajes más pequeños. Por ejemplo en el Linaje I el Clado 2 formado está seis “morfo-especies” diferentes: *R. geographicum* subsp. *arcticum*, *R. geographicum* subsp. *diabasicum*, *R. geographicum* subsp. *frigidum*, *R. macrosporum*, *R. riparium* subsp *lindsayanum* y *R. tinei*.

No se observa en la filogenia patrones evolutivos que respalden las “morfo-especies” estudiadas.

Caracterización morfológica de los linajes inferidos

Al margen del comportamiento de las “morfo-especies” en el árbol filogenético, es preciso discutir si los linajes que se definen en el mismo pueden ser caracterizados morfológica o químicamente. En las Figuras 5.3 y 5.4 vemos como los caracteres anatómicos relacionados con las ascósporas podrían ser útiles en la caracterización de ambos linajes; en el Linaje I las ascósporas son más pequeñas, con pocas células por espora (menos de 16 células) y anchuras menores o iguales a 16 μm ; al contrario las ascósporas presentes en los individuos que forman el Linaje II son más grandes, con más de 16 células, longitudes por encima de 31 μm y anchuras superiores a 16 μm -Tabla 5.5-.

En los análisis de la t- *Student* para las ascósporas, se observa que los 3 caracteres anatómicos relacionados con ellas (número de células, longitud y anchura) han resultado tener valores significativos. Existe superposición en cuanto a los valores de sus mínimos y máximos pero no para sus medias, desviación estándar y medianas. Así pues estos caracteres, pese a su dificultad de manejo (hay que realizar un número alto de medidas para tomar una decisión) pueden ser utilizados como caracteres diagnósticos de los linajes, siendo:

-Linaje I con ascósporas menores: con ≤ 16 células por espora y tamaños de ≤ 31 μm de longitud x ≤ 16 μm de ancho (sub-muriformes).

-Linaje II con ascósporas mayores: >16 células por espora y tamaños de > 31 μm de longitud x > 16 μm de ancho (eu-muriformes).

Esta caracterización no obstante encuentra excepciones. En el caso de las ascósporas del Linaje I el 41.2% de los individuos tendrían ascósporas con longitudes grandes, mientras que en el Linaje II ocurre algo similar con tamaños de ascósporas pequeñas, presente en el 36.7% de individuos.

El carácter diámetro del apotecio no apoya la caracterización de los linajes, ya que estadísticamente aparecen apotecios grandes ($\geq 601 \mu\text{m}$) en ambos -Tabla 5.5-. En los análisis de la *t-Student* -Tabla 5.6 y Fig. 5.4- vemos como el diámetro del apotecio (DAp), utilizado para definir la mayoría de las especies y subespecies del grupo -Capítulo 1- (Räsänen 1942a y b, 1949b; Runemark 1956a; Feuerer 1978 etc.), presenta valores no significativos ($p\text{-valor} \geq 0.05$). En el Capítulo 2, con las muestras que allí se usaban, este carácter anatómico presentaba valores significativos; aunque como se indicaba no se podía utilizar como carácter diagnóstico debido al solapamiento existente entre las medias, desviación estándar, mínimos y máximos calculados para ambos linajes. Al incluir más individuos y nuevas mediciones los valores en lugar de diferenciarse, como ha ocurrido con las ascósporas, se han solapado aún más -Tabla 5.6- por lo que dicho carácter anatómico queda excluido. En general los individuos del grupo de *R. geographicum* presentan, según nuestras observaciones, apotecios con diámetros medios entre 0.1 mm a 1.3 mm. Lo mismo ocurre con la reacción epihimieno a la KOH+: aunque aparece mayoritariamente en el Linaje I el número de individuos del Linaje II con reacción positiva es muy elevado.

Caracteres morfológicos (diámetro del apotecio) y químicos (reacción positiva del epihimieno a la KOH) a los que se les había otorgado un gran valor taxonómico (Anders 1923; Lynge 1932; Räsänen 1942a y b, 1943b, 1944, 1949b; Runemark 1956a; Thomson 1967; Feuerer 1978 etc.), no se compadecen con la topología del árbol filogenético.

Además, como se ha comprobado en el Capítulo 2, el resto de caracteres morfológicos y químicos utilizados tradicionalmente tampoco ajustan en los linajes detectados en el estudio filogenético.

Especies tipo

Dado que no se realizó extracción y secuenciación de ADN de las especies tipo por tratarse de material antiguo -el pliego más moderno es de hace más de 30 años- con las dificultades de amplificación y secuenciación asociadas a estos materiales (Cubero *et al.* 1998; Aras y Cansaran 2006; Redchenko *et al.* 2012), su comparación con el árbol filogenético del grupo -Fig. 5.5- está basada únicamente en la caracterización de las ascósporas.

En las descripciones de las especies del grupo -Capítulo 1- se aprecia que diferentes especies tienen ascósporas muy similares como *R. drepanodes*, *R. lecanorinum*, *R. macrosporum*, *R. sphaerosporum* o *R. sublucidum* con ascósporas más grandes en general (>16 células por espóra, >31 µm de longitud x >16 µm de anchura) o *R. geographicum* subsp. *arcticum*, *R. geographicum* subsp. *diabasicum* o *R. geographicum* subsp. *prospectans* con ascósporas más pequeñas.

La revisión de los tipos confirmó la fuerte variabilidad fenotípica de las especies del grupo, observada también en los materiales propios, sobre todo con respecto a caracteres anatómicos como el color y forma de las areolas, forma de los apotecios e incluso en la caracterización de las ascósporas. Esto es lo que conduce a los especialistas a describir numerosos taxones infraespecíficos y también numerosas “morfo-especies” (Anders 1923; Räsänen 1942a y b, 1943b, 1944, 1949b; Runemark 1956a; Thomson 1967; Feuerer 1978 etc.).

¿Qué ocurre entonces con el valor taxonómico de los caracteres fenotípicos en las especies y subespecies de *R. geographicum* s. lat.? Las observaciones realizadas sobre los tipos (Capítulo 1) como los resultados obtenidos en el presente capítulo y en el Capítulo 2, señalan que estos caracteres carecen de consistencia para definir hasta 17 taxones distintos, i.e. el patrón filogenético pone de manifiesto que diferencias fenotípicas que habían sido consideradas como caracteres discriminantes no lo son y deben ser considerados dentro de la variabilidad individual o poblacional (Crespo y Pérez-Ortega 2009; Amo de Paz 2012; Lumbsch y Leavitt 2011).

Probablemente la elevada plasticidad fenotípica detectada en el grupo le ha permitido colonizar diferentes hábitats y ampliar su distribución geográfica (Runemark 1956b; Wirth 1972, 1980; Feuerer 1978; Creveld 1981; Sancho 1986; Poelt 1988; Asta y Letouit-Galinou 1995; Sultan 2000; Sancho *et al.* 2001; Pigliucci 2001; Rabatel *et al.* 2008; Rojas-Fernández *et al.* 2008). Esta variabilidad fenotípica manifestada con diferencias anatómicas -morfológicas- y químicas (Runemark 1956a; Poelt 1988), puede deberse a adaptaciones de las poblaciones de una misma especie a las distintas condiciones de los micro-hábitats donde se desarrollan, como exposición a la radiación solar (intensificando el color amarillo de los talos según Clayden 2004), frecuencia de las precipitaciones, duración de la cubierta nival, sustrato etc. (Wirth 1980; Creveld 1981; Feuerer 1978; Sancho 1986).

Esta gran plasticidad añadida a la escasez de caracteres de algunos individuos o poblaciones puede conducir a delimitaciones de taxones morfológicos inconsistentes (Grube y Hawksworth 2007; Crespo y Pérez-Ortega 2009; Printzen 2010; Lumbsch y Leavitt 2011; Crespo 2012). Probablemente esto es lo que ha ocurrido en el grupo de *Rhizocarpon geographicum* e incluso en el subgénero *Rhizocarpon* (Ihlen y Ekman 2002). Este mismo patrón se observa en otros grupos de líquenes en los que la filogenia no ha respaldado el concepto fenotípico de especie, como en el grupo de '*Xanthoparmelia pulla*' (Amo de Paz *et al.* 2012), '*Cladonia gracilis*' (Pino-Bodas *et al.* 2011) o '*Parmelia sulcata*' (Molina *et al.* 2011).

Diversidad genética en las estaciones de muestreo

Con respecto a la diversidad genética el Linaje II presenta mayor diversidad que el Linaje I tanto para la región ITS nu como para LSU mt.

La región ITS nu es en general más variable que la región LSU mt en el grupo de *R. geographicum*: los valores de S, Hd y π son más elevados para ITS nu quedando patente la importancia de este *locus* en los estudios filogenéticos a nivel de especie en los hongos liquenizados (Crespo y Cubero 1998; Blanco *et al.* 2004; Divakar *et al.* 2005; Muggia *et al.* 2008; Vondrák *et al.* 2009; Crespo *et al.* 2010a; Pérez-Ortega *et al.* 2012; Schoch *et al.* 2012).

Aunque la región LSU mt ha sido utilizada en estudios de variabilidad intra-específica en diversos grupos de líquenes probando su utilidad para estos rangos (Zoller *et al.* 1999; Printzen 2002; Ott *et al.* 2004; Ferencova *et al.* 2010; Núñez-Zapata *et al.* 2011), nuestros resultados muestran que en el grupo de *R. geographicum* presenta baja variabilidad. Sin embargo en las áreas geográficas de Ch, Mx, PI y Sv los valores de S, Hd y π para el locus LSU mt serían elevados, acercándose a los obtenidos para la región ITS nu.

En general, la diversidad genética presente en el grupo es elevada, sobre todo para la región ITS nu con un número alto de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (h), y diversidad de haplotipos (Hd).

Patrones de distribución biogeográfica

Los patrones biogeográficos observados muestran distribución bipolar de los individuos incluidos en el grupo de *R. geographicum*: tanto en los dos grandes linajes como en clados monofiléticos más pequeños. Por ejemplo en el Linaje I -Fig. 5.3.a- el Clado 1 contiene individuos de Al junto con otros de TF y la AnM y en el Clado 2 se encuentran individuos de Al y Sv junto con individuos de TF y AnM. Dentro del Linaje II ocurre lo mismo -Fig. 5.3.b- el Clado 3 está formado por un individuo de Al y seis de la AnM.

En el mapa de la Fig. 5.6 (teniendo en cuenta áreas geográficas con más de 5 individuos del grupo) vemos como los 2 linajes están ampliamente distribuidos y tienen una diversidad geográfica y macro-ecológica similar: el Linaje I se encuentran en 12 áreas geográficas y el Linaje II en 11. Sin embargo el Linaje I aparece como único linaje evolutivo en la localidad de Ec y AnC mientras que en la India sólo aparece el Linaje II que por otro lado es muy mayoritario en Ch.

En las Fig. 5.3.a y b los Clados I (PI), II (Ec), III (AnC), IV (Nz), V (AnM) y VI (Sv) son claros ejemplos de correspondencia entre pequeños linajes evolutivos y un posible aislamiento geográfico de los especímenes, aunque en ellos encontramos diferentes “morfo-especies” clásicas. Por ejemplo en el Clado II aparecen seis “morfo-especies” *R. geographicum* subsp. *arcticum*, *R. geographicum* subsp. *prospectans*, *R. lecanorinum*, *R. macrosporum* y *R. tinei*.

Sin embargo no se ha encontrado ningún clado en el que aparecería una única “morfo-especie” de una misma localidad o área geográfica. En el Clado III en el que se ubican todos los individuos muestreados en la AnC, encontramos 3 “morfo-especies” en un muestreo de 5 individuos.

Los Clados A, B, C, D y E -Fig. 5.3.a y b- son ejemplos de la amplia distribución geográfica de *R. geographicum* s .lat. Por ejemplo en el Clado B encontramos individuos de áreas tan alejadas como el Polo Norte-Subártico (Al y Sv) junto a individuos del Polo Sur-Subantártico (AnM y TF) e individuos de altas montañas de zonas tropicales (Tw).

Los líquenes bipolares se encuentran frecuentemente en ambientes periglaciares, incluyendo no sólo las regiones polares sino también las regiones alpinas de zonas templadas y tropicales; estas últimas regiones son las que tienen mayor estabilidad a lo largo de la historia geográfica del planeta, siendo áreas de aislamiento prolongado y con frecuencia hábitats poco comunes en áreas de alta diversidad ecológica y geográfica (Galloway 2008).

La geografía se ha mostrado como uno de los principales factores limitantes para numerosas poblaciones naturales (Avice 1993; Buschbom 2003), influyendo en la estructura de las poblaciones por aislamiento al encontrar barreras debidas a la distancia o al tipo de dispersión (Buschbom 2003). Sin embargo nuestros resultados muestran que aunque pequeños linajes con individuos pertenecientes al grupo de *R. geographicum* se encuentran aislados geográficamente -Clados I , II, III, IV, V y VI, Fig. 5.3.a y b- no responden a procesos de especiación por aislamiento ya que estos individuos son muy similares anatómica y molecularmente a otros individuos de lugares geográficamente muy alejados, tratándose posiblemente de genotipos de una misma especie que han sufrido procesos de dispersión a larga distancia. Por ejemplo el Clado II forma un linaje junto con el espécimen *R. sublucidum* MAF-16655 de la PI, o el Clado III que formaría otro clado aún mayor con especímenes de *R. geographicum* subsp. *diabasicum*, *R. macrosporum*, *R. sublucidum* y *R. tinei* todos del área geográfica M.

Los patrones de distribución bipolar de organismos sésiles como son los líquenes y particularmente los crustáceos como *Lecidea* (Hertel 1987; Buschmon 2003;) o los individuos del grupo de *R. geographicum* (Runemark 1956a; Proctor 1983; Sancho y Valladares 1993; Winschester y Chaujar 2002) podrían explicarse en parte por procesos de deglaciación que conectaran lugares ahora aislados (Kappen y Straka 1988). O por procesos de dispersión a larga distancia de pequeños propágulos (ascósporas o soledios) a través de circulación planetaria global en capas altas de la atmósfera de las masas de aire o también trasportados en las migraciones de las aves (Hertel 1987; Meier *et al.* 2002; Muñoz *et al.* 2004).

Además estos procesos podrían no sólo transportar ascósporas viables del micobionte sino que es factible que se dispersen junto a los fotobiontes (Meier *et al.* 2002; ver Capítulo 4) garantizando así el éxito de la simbiosis liquénica y explicando además que individuos muy alejados geográficamente se ubiquen juntos en pequeños linajes -Fig. 5.3.a y b: Clados: A, B, C, D y E-.

CONCLUSIONES

Tras realizar estudios morfológicos y moleculares pormenorizados en un mayor número de “morfo-especies” del grupo de *Rhizocarpon geographicum* y abordar un muestreo mucho más amplio abarcando un ámbito mundial se han confirmado los resultados obtenidos en el Capítulo 2:

Las 17 “morfo-especies” estudiadas son polifiléticas y no presentan patrón evolutivo alguno. No se aprecia coherencia entre la topología filogenética y la caracterización conceptual de las mismas. Todas estas “morfo-especies” se ubican en un clado monofilético principal que correspondería a una única especie de acuerdo al concepto unificado de especie (De Queiroz 2007); en el conjunto se aprecian dos linajes evolutivos diferenciados sin clara caracterización fenotípica (a excepción de la estadística en las medidas esporales). Con el fin de poder precisar otras propiedades de estos linajes menores, su estudio debería profundizarse extendiéndose tanto a mayor número de muestras y a localidades más heterogéneas (e. g. de altitudes más bajas) como también a micro-hábitats diferenciados.

Se propone la sinonimia de estos 17 taxones bajo en el ‘binomen’ *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC., compartiendo caracteres anatómicos y químicos que además son notablemente variables. Esta especie mostraría una macro-ecología homogénea y una amplia distribución geográfica y bipolar.

Otras conclusiones del capítulo son:

- 1) La utilidad en taxonomía de los caracteres anatómicos y químicos usados tradicionalmente en el grupo es baja, incluso los relacionados con la caracterización de las ascósporas. Este hecho se pone de manifiesto en la confrontación de los caracteres con la filogenia del grupo y en el estudio de las especies tipo.
- 2) La elevada variabilidad genotípica y la alta plasticidad fenotípica observada en el grupo le ha permitido colonizar diferentes hábitats ampliando así su distribución geográfica, haciendo de *R. geographicum* s. lat. individuos ampliamente distribuidos y bipolares confirmándose con los análisis filogenéticos.
- 3) No se han detectado procesos de especiación por aislamiento, sin embargo los procesos de dispersión a larga distancia parecen ser comunes en la distribución mundial de los individuos del grupo estudiado.

DISCUSIÓN GENERAL



GENERAL DISCUSSION

El grupo de *Rhizocarpon geographicum* contiene 26 especies y subespecies distintas - Tabla 1.1- cuya identificación mediante la clave más moderna del grupo (Poelt 1988) resulta a menudo complicada debido a la variabilidad fenotípica de los individuos y al solapamiento y ambigüedad de los caracteres usados, incluso los referidos a las esporas (Poelt 1988).

Se han estudiado 17 de los 26 taxones -**Capítulo 1, Tabla 2.2 y Apéndice 5A**- basándonos en muestras que tienen una distribución muy amplia. La intención fundamental de la tesis ha sido definir el valor taxonómico de los caracteres anatómicos y químicos usados tradicionalmente en el grupo mediante la constatación de las relaciones filogenéticas entre las especies que se han definido a partir de tales caracteres.

La revisión de las especies tipo y su comparación con las descripciones de las especies y subespecies del grupo (**Capítulo 1**) puso de manifiesto una gran plasticidad fenotípica en *R. geographicum* s. lat. y la ambigüedad de los caracteres utilizados tradicionalmente en la definición de las especies del grupo. Se detectó que las especies presentaban incongruencias entre las descripciones originales y los especímenes tipo como en el caso de *R. saanaense* en el que Runemark dejó anotado “*The type specimen does not very much agree with original description*”.

Del mismo modo se han apreciado contradicciones entre éstas y las principales claves de identificación (Runemark 1956a; Poelt 1988). Por ejemplo en lo referente al carácter químico reacción KOH+ del epihimeno *R. prospectans* puede ser KOH+ o - según la descripción original pero en la clave de Poelt de 1988, en la que aparece como *R. geographicum* subsp. *prospectans*, únicamente se le identifica como KOH+. Esto mismo ocurre con las areolas en forma de collar observándose este tipo de areolas en muchos más especímenes tipo que las especies señaladas por las claves (Runemark 1956a; Poelt 1988).

Por otro lado, el estudio comparado de la filogenia del grupo, utilizando 2 marcadores genéticos (ITS nu y LSU mt), con 30 caracteres anatómico-químicos puso de manifiesto el escaso valor taxonómico que la mayoría de estos caracteres tenían sobre los linajes filogenéticos detectados (**Capítulo 2 y Capítulo 5**). Según nuestros resultados los distintos especialistas en el grupo habrían sobreestimado el valor de dichos caracteres (Räsänen 1942a y b, 1943b, 1944, 1949b; Runemark 1956a; Thomson 1967; Feuerer 1978; Poelt 1988) ya que al ser contrastados con la filogenia resultan fuertemente homoplásicos.

Lo que es especialmente interesante es que la filogenia mostró además que todos los individuos analizados se encontraban en un clado monofilético fuertemente respaldado (pp=1.00 y *bootstrap*=80%) -**Fig. 5.2**- en el que se detectaron dos linajes evolutivos y en los que las “morfo-especies” mostraron patrones polifiléticos -**Fig. 2.4.a y b, 2.5.a y b, 5.3.a y b**-.

Dada la importancia de la filogenia del marcador ITS nu para la interpretación de nuestros resultados hemos intentado confirmar la fidelidad del marcador. En otras palabras confirmar que la variabilidad que presenta el marcador en los distintos especímenes corresponde a filogenia y no a problemas inherentes del ITS nu de nuestras muestras. Por ejemplo la posibilidad de encontrar talos heterotálicos (Murtagh et al 2000; Honegger *et al.* 2004) o de repeticiones en tándem del ITS nu que fuesen distintas y pudieran explicar la variabilidad encontrada (Britten y Kohne 1968; Dawid 1980; Gandel y Kobayashi 2007). Igualmente se descartaron posibles errores en la extracción, amplificación y secuenciación del ADN. La prueba se efectuó con un número limitado pero suficiente de muestras y el resultado confirmó la variabilidad encontrada en el ITS nu (**Capítulo 3**).

Dado que nuestros análisis se basaban en dos genes aunque independientes (ITS nu y LSU mt), nos planteamos la necesidad de confirmar que los dos genes usados fueran mínimamente suficientes para los objetivos taxonómicos planteados. Para ello se probaron, con *primers* estándar, varias opciones: *elongation factor- α* , Mcm7, RPB1, RPB2. Con todos ellos se obtuvieron escasas tasas de éxito en las amplificaciones, siendo RPB1 el más eficiente. Por ello se usó este último en un 50% de las muestras correspondientes a la Península Ibérica (**Capítulo 2**). Este nuevo marcador no produjo mayor resolución en los análisis filogenéticos que la que detectaba el combinado ITS nu +LSU mt. Naturalmente ello no excluye que, de haberse probado algún otro marcador con *primers* diseñados específicamente, se hubieran podido obtener relaciones más precisas que las que se reflejan en nuestros resultados (**Capítulo 3**).

Buscando nuevos elementos que pudieran explicar las relaciones filogenéticas observadas en el grupo de *R. geographicum*, se estudió el fotobionte analizando la diversidad genética de éste y sus patrones biogeográficos; posteriormente se comparó con los resultados obtenidos del análisis filogenético del micobionte (**Capítulo 4**). Se observó que el fotobionte se correspondía con especies del género *Trebouxia* -género que incluye los fotobiontes más comunes presentes en hongos liquenizados (Beck 1999; Hauck *et al.* 2007; Del Campo *et al.* 2010)-. Las asociaciones más comunes fueron con *T. jamesii* y *T. angustilobata*.

No se observaron patrones de selectividad de las diferentes “morfo-especies” de micobionte hacia el fotobionte. Cabe decir que ni si quiera se observaron patrones de co-evolución o alta selectividad a nivel de los dos linajes detectados en el micobionte. La baja selectividad observada en el micobionte hacia el fotobionte podría permitir a los individuos de *R. geographicum* colonizar una mayor amplitud de hábitats donde encontrarían disponibles grupos diferentes de fotobiontes (Romeike *et al.* 2002; Wirtz *et al.* 2003).

Se contrastó de nuevo la filogenia, ahora ampliándola a escala mundial, con 5 caracteres anatómico-químicos (DAP, CSp, LgSp, AnSp y KOH) que se presentaban como posibles caracteres diagnósticos para cada linaje de micobionte detectado, por su significancia en varios análisis estadísticos (**Capítulo 2**). Aunque con rangos muy estrechos, se encontró que 3 de ellos, los relacionados con las ascósporas, podían caracterizar cada linaje evolutivo: el Linaje I presentaría esporas más pequeñas con menor número de células (sub-muriformes) y el Linaje II esporas más grandes con mayor número de células (eu-muriformes) -**Capítulo 5**-.

Ambos linajes podrían considerarse como 2 especies crípticas (Crespo y Pérez-Ortega 2009) definidas por la caracterización de sus ascósporas. Sin embargo hemos considerado que además de que este tipo de esporas (murales y de color verdoso o marrón) pueden haber aparecido varias veces en la historia evolutiva del grupo (Ihlen y Ekman 2002), no se tiene de momento suficiente apoyo para reconocer dos especies. Los datos de los que disponemos con respecto a la macro-ecología y distribución geográfica no permiten discriminar entre ambos linajes. La definición de dos especies crípticas según los dos linajes evolutivos detectados reclamaría un estudio detallado de las condiciones micro-ecológicas y una ampliación de las geográficas. En el aspecto geográfico sería aconsejable ampliar el muestreo abarcando un rango altitudinal mayor, sobre todo incorporando muestras de altitudes bajas de zonas templadas.

Naturalmente es esencial añadir las 9 especies y subespecies del grupo que en el presente trabajo no se incluyeron. Por último, para este trabajo debería efectuarse un estudio poblacional e incrementar el número de marcadores moleculares.

En consecuencia, tras el análisis filogenético de las especies y el estudio de los caracteres morfológicos y su variabilidad no se ha encontrado correlación entre el concepto de tales especies reconocido por sus respectivos autores y la filogenia de los linajes (concepto unificado de especie).

Se propone la delimitación de una única especie que responda al linaje principal que muestra la topología filogenética. Por tanto, se procede a establecer la sinonimia de los 17 taxones estudiados en el 'binomen' *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC.

Sinonimia:

Rhizocarpon geographicum (L.) DC.

– ESPAÑA: Madrid, Sierra de Guadarrama, Pico de la Najarra, 2020 m, 40°49'15"N 03°49'48"O, B. Roca-Valiente & S. Pérez Ortega, 25-X-2007 (MAF-16646 — *epitypus hic designatus*).

Syn. *Lichen geographicus* LINNEO 1753 p. 1140. – *Lichen atrovirens* LINNEO 1753 p. 1141. – *Lecidea atrovirens* (L.) ACHARIUS 1803 p. 45. – *Lecidea atrovirens* var. *geographica* (L.) ACHARIUS 1803 p. 45. – *Lecidea geographica* (L.) REBENTISCH 1804 p. 294. – *Leproncus geographicus* (L.) SAINT-HILAIRE 1805 p. 19. – *Rhizocarpon geographicum* LAMARCK y DE CANDOLLE 1805 p. 365. – *Rhizocarpon atrovirens* (L.) CHEVALLIER 1826 p. 561. – *Lecidea geographica* f. *urceolata* SCHAERER 1828 p. 124. – *Lecidea geographica* var. *atrovirens* (L.) SCHAERER 1828 p. 124. – *Patellaria geographica* (L.) DUBY 1830 p. 656. – *Patellaria atrovirens* (L.) WALLROTH 1831 p. 358. – *Lecidea tinei* TORNABENE 1848 p.17. – *Abacina atrovirens* (L.) NORMAN 1853 p. 236. – *Diplotomma geographicum* (L.) JATTA 1880 p. 229. – *Lecidea nidifica* HUE 1915 p. 171. – *Rhizocarpon lecanorinum* ANDERS 1923 p. 261. – *Rhizocarpon nidificum* (Hue) DARBISHIRE 1923 p. 48. – *Rhizocarpon diabasicum* RÄSÄNEN 1942a p. 59. – *Rhizocarpon lindsayanum* RÄSÄNEN 1942b p. 87. – *Rhizocarpon riparium* RÄSÄNEN 1942a p. 60. – *Rhizocarpon saanaense* RÄSÄNEN 1942a p. 61. – *Rhizocarpon macrosporum* RÄSÄNEN 1943b p. 139. – *Rhizocarpon frigidum* RÄSÄNEN 1944 p. 9. – *Rhizocarpon prospectans* RÄSÄNEN 1944 p. 8. – *Rhizocarpon sphaerosporum* RÄSÄNEN 1944 p. 6. – *Rhizocarpon sublucidum* RÄSÄNEN 1947 p. 3. – *Rhizocarpon ferax* MAGNUSSON 1948 p. 405. – *Rhizocarpon tavaresii* RÄSÄNEN 1949b p. 85. – *Rhizocarpon tinei* subsp. *arcticum* RUNEMARK 1956a p.125. – *Rhizocarpon tinei* (Tornab.) RUNEMARK 1956a p. 118. – *Rhizocarpon riparium* (Räs.) subsp. *lindsayanum* (Räs.) THOMSON 1967 p. 456. – *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. subsp. *prospectans* (Räs.) HAWKSWORTH & SOWTER 1969 p. 58. – *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. subsp. *arcticum* (Runem.) HERTEL 1976 p.493. – *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. subsp. *frigidum* (Räs.) HERTEL 1976 p. 492. – *Rhizocarpon drepanodes* FEUERER 1978 p. 67. – *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. subsp. *diabasicum* (Räs.) POELT & VĚZDA [In Hawksworth, James & Coppins] 1980 p. 107.⁵

⁵ Para los sinónimos dados a las distintas especies y subespecies: Räsänen (1942a y b; 1943b; 1944; 1949b); Runemark (1956a); Thomson (1967); Feuerer (1978); Poelt (1988) y en otros trabajos como Hawksworth y Sowter (1969) así como en la base de datos de Index Fungorum (Kirk 2000) y Mycobank (Crous *et al.* 2004).

Diagnosis de *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC.

Con el fin de proporcionar una imagen de la variabilidad y detalles que se han contrastado en nuestro estudio, se facilita una descripción ampliada:

Talo crustáceo saxícola areolado que crece generalmente en rocas silíceas y otros materiales ácidos, pudiendo aparecer excepcionalmente en materiales básicos. Los talos pueden ser pequeños, menores de 1 cm, a talos enormes de más de 5 cm. Protalo bien desarrollado, a menudo visible entre las areolas. Areolas planas o convexas de color amarillo a amarillo-verdoso, con frecuencia subdivididas, de 0.1-4 mm de diámetro y 130-1140 μm de espesor. Medula I+ azul y Pd+ amarillo, naranja o rojo teja. Las areolas pueden crecer pegadas a los apotecios rodeándolos en algunos casos como un collar, pueden estar dispersas en el protalo cuando éste está bien desarrollado o crecer pegadas las unas a las otras formando un continuo. Los apotecios se encuentran entre las areolas, pegados a ellas o dispersos en el prótalo, desarrollándose por encima de él, suelen ser abundantes en individuos maduros. Planos o cóncavos de color negro, angulares o circulares, marginados y de 110-1700 μm de diámetro y 170-740 μm de altura. Los apotecios son de tipo lecideinos carecen de reborde o excípulo talino, con asco clavado unitunicado de tipo *Rhizocarpon*. Excípulo e hipotecio de color marrón-negro hasta color carbón. El excípulo puede medir entre 25 y 200 μm de ancho. Himenio hialino, oxido o verdoso según individuos, más bien alto (90-400 μm) y mucilaginoso, con paráfisis en forma de red, cuyas células apicales son transparentes y clavadas. El epihimenio (epitecio) puede dar reacción KOH+ de color rojo/violeta o KOH-intensificando el color de este (marrón-oxido o verdoso). Ascósporas: 8 por ascos, oblongas a elípticas. Son murales con 2 o 4 septos transversales a fuertemente muriformes (submuriformes o eu-muriformes), de entre 3 y 50 células por ascósporas, 13-70 μm de longitud y 8-25 μm de anchura, según individuos. Presentan halo al menos al comienzo de su desarrollo, y son transparentes o de color generalmente verde oliva a marrón.

Química: todos los individuos contienen ácido rhizocárpico, pudiendo contener frecuentemente ácido psorómico. También existen individuos en los que se puede encontrar ácidos del complejo del ácido estético, así como el propio ácido estético, ácido norestético, ácido hipoestético, ácido girofórico y raramente ácido barbático.

Ecología y distribución geográfica: se pueden encontrar individuos desde los 660 m de altitud, en latitudes medias, a las más altas cumbres alpinas de sustrato ácido. Se distribuye por todo el planeta desde zonas templadas a zonas boreales, tropicales y en ambos polos. Las condiciones ambientales propias son de intensidad muy variable en lo referente a la luz, exposición al viento, humedad, cubierta nival, temperatura y nivel trófico. Prefiere las exposiciones con mayor irradiación, zonas con presencias periódicas de humedad, cubierta nival, inundaciones por deshielo o largos periodos de lluvia siendo estos últimos los factores más limitantes. Existen pues distintas preferencias ambientales según las latitudes y los individuos atendiendo estas más a condiciones micro-climáticas y micro-ecológicas que de la ecología general de los hábitats donde se encuentran. El micro-hábitat influye sobre las tasas de crecimiento de los talos y el desarrollo general del líquen haciéndolo fenotípicamente muy variable. Su distribución geográfica es por tanto amplia y bipolar.

CONCLUSIONS

Main conclusion

The phylogenetic study of the *Rhizocarpon geographicum* group reveals one supported lineage, including 229 specimens of 17 putative taxa, and it is consistent with the wide morphological concept of *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC., corresponding to Linnaeus' *Lichen geographicus*. Linnaeus (based in Dillenius) described it as "*Lichenoides nigro flavum, tabulae geograficae instar pictum*". We complemented this description with ascospore characterization (brown-green and muriform or submuriform), and growing on non calcareous rocks with a bipolar, alpine and subalpine worldwide distribution.

Complementary conclusions

-Studied taxa in the *Rhizocarpon geographicum* group are not monophyletic and consequently any of them correspond to species according to unified species concept (De Queiroz 2007). We have kept the quotation of "morpho-species" to the species described by their morphological characters in this study for a better comprehension.

-We clearly detected ambiguity between morpho-chemical characters and its variability range. The characters were not consistent with the inferred phylogenetic tree topology.

-Two secondary lineages are detected within the *R. geographicum* (L.) DC. They are not consistent with previous taxonomic units or with a clear morphological characterization. However, ascospore measurements can distinguish both lineages in our current data, but only after measuring many individuals. Phylogeny, ecology and phylogeography additional studies will improve the evolutionary and taxonomic knowledge of both lineages.

-Genus *Trebouxia* is the habitual photobiont in *R. geographicum* (L.) DC., and *Trebouxia jamesii* and *Trebouxia angustilobata* are the most common symbiotic partners. No specificity/selectivity or co-evolution patterns have been found between the symbionts.

CONCLUSIONES

De este trabajo se extrae una **conclusión principal**:

La topología del árbol filogenético muestra que los 229 especímenes de 17 especies estudiados de manera completa (incluyendo análisis moleculares) se agrupan en un único linaje principal bien respaldado que es consistente con el amplio concepto morfológico de *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC., que corresponde con el *Lichen geographicus* de Linneo. Linneo mismo basado en Dillenius lo definió como “*Lichenoides nigro flavum, tabulae geograficae instar pictum*”. A esta descripción a penas tendríamos que añadir la caracterización de las esporas oscuras sub-murales y su hábitat en sustratos rocosos no calcáreos de las zonas bipolares, alpinas y subalpinas de todo el mundo. En este trabajo se propone la sinonimia de los restantes 16 binómenes analizados.

Conclusiones complementarias:

-Las especies estudiadas del grupo de *Rhizocarpon geographicum* no han resultado monofiléticas. No cumpliendo por tanto la propiedad básica en el concepto unificado de especie (De Queiroz 2007). Tales especies que fueron descritas por sus caracteres morfológicos las hemos llamado “morfo-especies” en el desarrollo de este estudio.

-Se apreciaron conceptos dispares entre sus caracteres morfo-químicos y el rango atribuido a la variabilidad de estos. Tales caracteres no resultaron coherentes con la topología del árbol filogenético inferido.

-La topología filogenética muestra dos linajes menores en los que no se aprecia patrón taxonómico alguno en relación con estudios morfológicos o florísticos previos.

-Ambos linajes incluyen muestras que podrían caracterizarse por una débil diferencia en el tamaño de las esporas. La filogenia, ecología de detalle y filogeografía de tales linajes merece posteriores estudios para completar su conocimiento evolutivo y taxonómico.

-Los fotobiontes presentes en *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. son del género *Trebouxia*, realizando la simbiosis liquénica con mayor frecuencia con las especies de *Trebouxia jamesii* y *Trebouxia angustilobata*. No se han observado patrones de selectividad/especificidad ni co-evolución de los simbiosiontes.

BIBLIOGRAFÍA

LITERATURE CITED

- Acharius E. (1803). *Methodus qua omnes detectos Lichenes secundum organa carpomorpha ad genera*. Ulrich.
- Ahmadjian V. (1967). A guide to the algae occurring as lichen symbionts: Isolation, culture, cultural physiology, and identification. *Phycologia* **6**: 127-160.
- Anders J. (1923). Zur Flechtenflora des Isergebirges. *Hedwigia* **64**.
- Andersson L. (1990). The driving force: Species concepts and ecology. *Taxon* **39**: 375-382.
- André M-F. (1986). Dating slope deposits and estimating rates of rock wall retreat in northwest Spitsbergen by lichenometry. *Geografiska Annaler* **68** (1/2): 65-75.
- Amo de Paz G. (2012). Estudios filogenéticos y evolutivos sobre *Xanthoparmelia* y géneros relacionados (Parmeliaceae, Ascomycota). Tesis Doctoral. Facultad de C.C. Biológicas. UCM. Madrid.
- Amo de Paz G., Lumbsch H.T., Cubas P., Elix J.A., Crespo A. (2010). The genus *Karowia* (Parmeliaceae, Ascomycota) includes unrelated clades nested within *Xanthoparmelia*. *Australian Systematic Botany* **23**: 173-184.
- Akaike H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* **19**: 716-723.
- Aras S., Cansaran D. (2006). Isolation of DNA for sequence analysis from herbarium material of some lichen specimens. *Turkish Journal of Botany* **30**: 449-453.
- Arnold F. (1871). Lichenologische Fragmente, XII. *Flora* **53**. Regensburg.
- Argüello A., Del Prado R., Cubas P., Crespo A., (2007). *Parmelia quercina* (Parmeliaceae Lecanorales) incluye four phylogenetically supported morphospecies. *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 455-467.
- Armstrong R.A. (1983). Growth curve of the lichen *Rhizocarpon geographicum*. *New Phytologist* **94**: 619-622.
- Armstrong R.A. (2004). Lichens, Lichenometry and Global Warming. *Microbiologist* **5** (3): 32-35.
- Armstrong R.A. (2007). The unnatural history of the lichen *Rhizocarpon geographicum*. *Microbiologist* **8** (2): 36-39.
- Armstrong R.A. (2011). The biology of the crustose lichen *Rhizocarpon geographicum*. *Symbiosis* **55**: 53-67.
- Armstrong R.A., Smith S.N. (1987). Development and growth of the lichen *Rhizocarpon geographicum*. *Symbiosis* **3**: 287-300.
- Armstrong R.A., Smith S.N. (1996). Do the lichens *Xanthoparmelia conspersa* (Ach.) Hale and *Rhizocarpon* Ram. Em. Th. Fr. subgenus *Rhizocarpon* utilize exogenous carbohydrates for radial growth? *Environmental and Experimental Botany* **36** (1):13-20.
- Armstrong R.A., Bradwell T. (2010). Growth of crustose lichens: a review. *Geografiska Annaler* **92**: 3-17.
- Armstrong R. L., Brodzik M.J. (2001). Recent Northern Hemisphere Snow Extent: A comparison of data derived from visible and Microwave satellite sensors. *Geophysical Research Letters* **28** (19): 3673-3676.
- Articus K., Mattsson J-E., Tibell L., Grube M., Wedin M. (2002). Ribosomal DNA and β -tubulin data do not support the separation of the lichens *Usnea florida* and *U. subfloridana* as distinct species. *Mycological Research* **106**: 412-418.
- Ascaso C., Galvan J. (1976). The ultrastructure of the symbionts of *Rhizocarpon geographicum*, *Parmelia conspersa* and *Umbilicaria pustulata* growing under dryness conditions. *Protoplasma* **87** (4): 409-418.
- Asplund J., Gauslaa Y. (2008). Mollusc grazing limits growth and early development of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* in broadleaved deciduous forests. *Oecologia* **155**: 93-99.
- Asta J., Letrouit-Galinou M.A. (1995). Observations on the early growth of *Rhizocarpon geographicum* thalli. *Herzogia* **11**: 239-252.
- Avisé J.C. (1993). *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, ITP International Thomson Publishing, New York.
- Bamber J.L., Payne A.J. (2004). *Mass Balance of the Cryosphere: Observations and Modelling of Contemporary and Future Changes*. Cambridge University Press.
- Baral H-O. (1992). Vital versus herbarium taxonomy: morphological differences between living and dead cells of ascomycetes, and their taxonomic implications. *Mycotaxon* **44**: 333-390.
- Barkman J. (1958). *Phytosociology and ecology of cryptogamic epiphytes*. The Netherlands: Assen.
- Barreno E., Pérez-Ortega S. (2003). *Líquenes de la Reserva Integral de Muniellos, Asturias*. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras del Principado de Asturias.
- Beck A. (1999). Photobiont inventory of a lichen community growing on heavy-metal-rich rock. *The Lichenologist* **31**: 501-510.
- Beck A. (2002). Selektivität der Symbionten schwermetalltoleranter Flechten. Tesis doctoral, Ludwig-Maximilians Universität München. Munich. Alemania.
- Beck A., Friedl T., Rambold G. (1998). Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *New Phytologist* **139**: 709-720.
- Beck A., Kasalicky T., Rambold G. (2002). Myco-photobiontal selection in a Mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida*. *New Phytologist* **153**: 317-326.
- Bench G., Clark B.M., Mangelson N.F., St. Clair L.L., Rees L.B. et al. (2001). Accurate lifespan estimates cannot be obtained from ^{14}C profiles in the crustose lichen *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. *The Lichenologist* **33**: 539-542.
- Benedict J.B. (1988). Techniques in lichenometry: Identifying the yellow Rhizocarpons. *Arctic and Alpine Research* **20** (3): 285-291.
- Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N.S., Ng P.K.L., Meier R. et al. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecology & Evolution* **22**: 148-155.
- Blanco O., (2004). Filogenia de *Parmelia* s. lat. (Parmeliaceae, Lecanorales) basada en caracteres moleculares. Análisis comparado con los caracteres morfológicos. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.

- Blanco O., Crespo A., Elix J.A., Hawksworth D.L., Lumbsch H.T. (2004). A molecular phylogeny and a new classification of parmelioid lichens containing Xanthoparmelia-type lichenan (Ascomycota: Lecanorales). *Taxon* **53** (4): 959-975.
- Blanco O., Crespo A., Divakar P.K., Elix J.A., Lumbsch H.T. (2005). Molecular phylogeny of parmotremond lichens (Ascomycota, Parmeliaceae). *Mycologia* **97** (1): 150-159.
- Blanco O., Crespo A., Ree R.H., Lumbsch H.T., (2006). Major clades of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) and the evolution of their morphological and chemical diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **39**: 52-69.
- Boch S., Prati D., Werth S., Rüttschi J., Fischer M. (2011). Lichen Endozoochory by Snails. *PLoS ONE* **6** (4): e18770.
- Bradwell T. (2010). Studies on the growth of *Rhizocarpon geographicum* in NW Scotland, and some implications for lichenometry. *Geografiska Annaler: Series A, Physical Geography* **92** (1): 41-52.
- Bradwell T., Armstrong R.A. (2007). Growth rates of *Rhizocarpon geographicum* lichens: a review with new data from Iceland. *Journal of Quaternary Science* **22** (4): 311-320.
- Braithwaite R.J. (2002). Glacier mass balance: the first 50 years of international monitoring. *Progress in Physical Geography* **26** (1): 76-95.
- Brodo I.M., Sharnoff S.D., Sharnoff S. (2001). *Lichens of North America*. Yale University Press.
- Bull W.R., Brandon M.T. (1998). Lichen dating of earthquake-generated regional rockfall events, southern Alps, New Zealand. *The Geological Society of America* **110**: 60-84.
- Büdel B. y Henssen A. (1983). *Chroococciopsis* (Cyanophyceae), a phycobiont in the lichen family Lichinaceae. *Phycologia* **22**: 367-375.
- Buschbom J. (2003). Evolutionary history and processes underlying contrasting reproductive modes in the lichen-forming genus *Porpidia* (Ascomycota). Tesis Doctoral. The faculty of the division of the biological sciences and the pritzker school of medicine. Chicago, Illinois.
- Cadwell R. C., Joyce G. F. (1994). Mutagenic PCR. *Genome Research* **3** (6): S136-S140.
- Cardinale M., Puglia A.M., Grube M. (2006). Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *Microbiology Ecology* **57** (3): 484-495.
- Carstens B.C., Dewey T.A. (2010). Species Delimitation Using a Combined Coalescent and Information-Theoretic Approach: An Example from North American Myotis Bats. *Systematic Biology* **59** (4): 400-414.
- Caseldine C., Baker A. (1998). Frequency distributions of *Rhizocarpon geographicum* s.l., modeling, and climate variation in Tröllaskagi, Northern Iceland. *Arctic and Alpine Research* **30** (2): 175-183.
- Castresana J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**: 540-552.
- Casano L.M., del Campo E.M., García-Breijo F.J., Reig-Armiñana J., Gasulla F., et al. (2011). Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus Competition? *Environmental Microbiology* **13** (3): 806-818.
- Chang C-Y., LaBaer J. (2005). DNA polymorphism detector: an automated tool that searches for allelic matches in public databases for discrepancies found in clone or cDNA sequences. *Bioinformatics (Applications Note)* **21** (9): 2133-2135.
- Chevallier F. F. (1826). *Flore générale des environs de Paris selon la méthode naturelle*. Paris.
- Chooi Y-H., Stalker D.M., Davis M.a., Fujii I., Elix J.A. et al. (2008). Cloning and sequence characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from the lichen *Xanthoparmelia semiviridis*. *Mycological Research* **112**: 147-161.
- Clayden S. (1997). Intraspecific interactins and parasitism in an association of *Rhizocarpon lecanorinum* and *R. geographicum*. *The Lichenologist* **29** (6): 533-545.
- Clayden S. (1998). Thallus initiation and development in the lichen *Rhizocarpon lecanorinum*. *New Phytologist* **139**: 685-695.
- Clayden S. (2004). The yellow-pigmented taxa of *Rhizocarpon* (lichen-forming Ascomycota) in Snowdonia, North Wales: diversity and life history studies. Ph.D. Thesis. University of London, UK.
- Clayden S. Pentecost, A., MacG. Dawson, R.J., (2004). Growth of the Lichen *Rhizocarpon lecanorinum*, with comments on Aplin-Hill and Lichenometric Curves. *Symbiosis* **37**: 379-393.
- Clement M., Posada D., Crandall K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**: 1657-1660.
- Clerc P. (1998). Species concepts in the Genus *Usnea* (Lichenized Ascomycetes). *The Lichenologist* **30** (4-5): 321-340.
- Crespo A. (2012). *El discurrir de una ciencia amable y la vigencia de sus objetivos: de Linneo al código de barras de ADN se pasa pro Darwin*. Discurso leído en el acto de su recepción como académica de número. Real Academia de Ciencia Exactas, Físicas y Naturales. Madrid.
- Crespo A., Cubero O.F. (1998). A molecular approach to the circumscription and evaluation of some genera segregated from *Parmelia* s.lat. *The Lichenologist* **30**: 369-380.
- Crespo A., Blanco O., Hawksworth D.L. (2001). The potential of mitochondrial DNA for establishing phylogeny and stabilising generic concepts in the parmelioid lichens. *Taxon* **50**: 807-819.
- Crespo A., Molina M.C., Balco O., Schroeter B., Sancho L.G. et al. (2002). rDNA ITS and b-tubulin gene sequence analyses reveal two monophyletic groups within the cosmopolitan lichen *Parmelia saxatilis*. *Mycological Research* **106** (7): 788-795.
- Crespo A., Lumbsch H.T., Mattson J-E., Divakar P.K., Articus K. et al. (2007). Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in *Parmeliaceae* (Ascomycota) using three ribosomal markers and the nuclear RPB1 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **4** (2): 812-824.

- Crespo A., Pérez-Ortega S. (2009). Cryptic species and species pairs in lichens: A discussion on the relationship between molecular phylogenies and morphological characters. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **66** (S1): 71-81.
- Crespo A., Ferencova Z., Pérez-Ortega S., Elix J.A., Divakar P.K. (2010a). *Austroparmelina*, a new Australasian lineage in parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota). *Systematic Biodiversity* **8** (2): 209-221.
- Crespo A., Kauff F., Divakar K.P., Prado R., Pérez-Ortega S. *et al.* (2010b). Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon* **59** (6): 1735-1753.
- Creveld M. (1981). Epilithic lichen communities in the alpine zone of southern Norway. *Bibliotheca Lichenologica*, FL-9490 Vaduz.
- Crous P.W., Gams W., Stalpers J.A., Robert V., Stegehuis G. (2004). Mycobank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology* **50**: 19-22.
- Cubero O.F., Crespo A., Fatehi J., Bridge P.D. (1998). DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant Systematics and Evolution* **216**: 243-249.
- Culberson C. F., Kristinsson H.-D. (1970). A standardized method for the identification of lichen products. *Journal of Chromatography* **46**: 85-93.
- Culberson C.F. (1972). Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of chromatography* **72**: 113-125.
- Culberson C.F. (1986). Biogenetic relationships of the lichen substrates in the framework of systematic. *The Bryologist* **89**: 91-98.
- Darbishire O.V. (1923). British Antarctic (Terra Nova) Expedition 1910. [In:] *Botany, Part III, Lichens*: 48. London.
- Darwin C.R. (1859). *On the Origin of Species by Means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. London (1^o ed.): John Murray.
- Dayrat B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of Linnean Society* **85**:407-415.
- De la Torre Noetzel R. (2002). Estudio de los efectos de la radiación UV sobre ecosistemas epilíticos. Tesis Doctoral. Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.
- De la Torre Noetzel R., Sancho L.G., Pintado A., Rettberg P., Rabbow E. *et al.* (2007). BIOPAN experiment LICHENS on the Foton-M2 mission: pre-flight verification tests of the *Rhizocarpon geographicum*-granite ecosystem. *Advances in Space Research* **40**: 1665-1671.
- De la Torre Noetzel R., Sancho L.G., Horneck G., de los Ríos A., Wierzos J. *et al.* (2010). Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions - Results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* **208**: 735-748.
- De Queiroz K. (1998). The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. [In:] *Endless forms: Species and speciation* (D. J. Howard and S. H. Berlocher, Eds.): 57-75. Oxford University Press, New York.
- De Queiroz K. (1999). The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. [In:] *Species: New interdisciplinary essays* (R. A. Wilson, Ed.): 49-89. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- De Queiroz K. (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology* **56**(6):879-886.
- De Sa R.O., Heyer W.R., Camargo A. (2005). Are *Leptodactylus didymus* and *L. mystaceus* phylogenetically sibling species (Amphibia, Anura, Leptodactylidae)? *Herpetologia Petropolitana* **12**: 90-92.
- Del Campo E.M., Casano L.M., Gasulla F., Barreno E. (2010). Suitability of chloroplast LSU rDNA and its diverse group I introns for species recognition and phylogenetic analyses of lichen-forming *Trebouxia* algae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 437-444.
- Del Prado R., Cubas P., Lumbsch H.T., Divakar P.K., Blanco O. *et al.* (2010). Genetic distances within and among species in monophyletic lineages of *Parmeliaceae* (Ascomycota) as a tool for taxon delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **56**: 125-133.
- Dillenius J. J. (1742) [1741]. *Historia muscorum*. Oxford: Sheldoniano Theatre
- Divakar P.K., Molina M.C., Lumsch H.T., Crespo A. (2005). *Parmelia barrenoae*, a new species related to *Parmelia sulcata* (Parmeliaceae) based on molecular and morphological data. *The Lichenologist* **37** (1): 37-46.
- Divakar P.K., Lumsch H.T., Ferencova Z., Del Prado R., Crespo A. (2010). *Remototrachyna*, a newly recognized tropical lineage of lichens in the *Hypotrachyna* clade (*Parmeliaceae*, Ascomycota), originated in the indian subcontinent. *American Journal of Botany* **97** (4): 579-590.
- Dodge C.W. (1973). *Lichen flora of the Antarctic Continent and Adjacent Islands*. Antarctic Lichens. Phoenix Publishing.
- Doering M., Piercey-Normore M.D. (2009). Genetically divergent algae shape an epiphytic lichen community on Jack Pine in Manitoba. *The Lichenologist* **41**: 69-80.
- Donoghue M. J. (1985). A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *The Bryologist* **88**: 172-181.
- Drummond A. J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A. *et al.* (2010). Geneious v 5.3, available from www.geneious.com.
- Duby J. E. (1830). *Botanicon gallicum*. Tomo II. Ed. 2.
- Duminil J., Caron H., Scottii I., Cazal S.-O., Petit R.J. (2006). Blind population genetics survey of tropical rainforest trees. *Molecular Ecology* **15**: 3505-3513.
- Ebach M.C., Williams D.M. (2009). How objective is a definition in the subspecies debate? *Nature* **457**: 785.
- Edgar R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32** (5): 1792-1797.
- Ekman S., Andersen H. L., Wedin M. (2008). The limitations of ancestral state reconstruction and the evolution of the ascus in the Lecanorales (Lichenized Ascomycota). *Systematic Biology* **57** (1): 141-156.

- Elix J.A., Johnston, J. & Armstrong, P.M. (1986). A revision of the lichen genus *Xanthoparmelia* in Australasia. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series* **15**(3): 163-362.
- Elix J.A. (1993). Progress in the Generic Delimitation of *Parmelia* sensu lato Lichens (Ascomycotina: Parmeliaceae) and a Synoptic Key to the *Parmeliaceae*. *The Bryologist* **96** (3): 359-383.
- Elix J.A. (1996). Biochemistry and Secondary Metabolites. [In:] *Lichen Biology* (T.H. Nash III, Ed.): 154-180. Cambridge: Cambridge University Press.
- Estrada B., Palenzuela J., Barea J.M., Ruiz-Lozano J.M., Da Silva G.A. *et al.* (2011). *Diversispora clara* (*Glomeromycetes*) – a new species from saline dunes in the Natural Park Cabo de Gata (Spain). *Mycotaxon* **118**: 73-81.
- Etayo J., Sancho L. G., Gómez-Bolea A. (1994). Excursión de la SEL al valle de Tena (Pirineo Aragonés). Ed. *Policopiada*: 1-27.
- Etayo J., Palice Z., Spribille T. (2009). *Candelariella boleana*, a new epiphytic species from southern and central Europe (Candelariaceae, Ascomycota). *Nova Hedwigia* **89** (3-4): 545-552.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47-50.
- Fries TH.M. (1874). *Lichenographia Scandinavica II*. Upsaliae.
- Ferencova Z. (2012). Estudio morfológico comparado de los caracteres generativos en relación con los linajes monofiléticos de la familia *Parmeliaceae* (Lecanorales, Ascomycota). Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.
- Ferencova Z., del Prado R., Pérez-Vargas I., Hernández-Padrón C., Crespo A. (2010). A discussion about reproductive modes of *Pseudevernia furfurácea* based on phylogenetic data. *The Lichenologist* **42** (4): 449-460.
- Fernández-Mendoza F., Domaschke S., García M. A., Jordan P., Martín M. P. *et al.* (2011). Population structure of mycobionts and photobionts of the widespread lichen *Cetraria aculeata*. *Molecular Ecology* **20** (6): 1208-1232.
- Feuerer T. (1978). Zur kenntnis der Flechtengattung *Rhizocarpon* in Bayern. *Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft* **49**: 59-135.
- Feuerer T. (1991). Revision der europäischen Arten der Flechtengattung *Rhizocarpon* mit nichtgelben Lager und vielzelligen Sporen. *Bibliotheca Lichenologica* **39**: 1-218.
- Feuerer T. (2011). *Checklists of lichens and lichenicolous fungi*. Version 1 January 2011. www.checklists.de.
- Feuerer T., Timdal E. (2004). *Rhizocarpon*. [In:] *Lichen flora of the Greater Sonoran Desert Region*. Vol. II (T.H. Nash III, B. D. Ryan, C. Gries & F. Bungartz, Eds.): 456.
- Feuerer T., Ahti T., Vitikainen O. (1998). Lichenological Investigations in Bolivia. [In:] *Lichenology in Latin America: History, Current Knowledge and Applications*. (M.P. Marcelli & M.R.D. Seaward, Eds.): 71-86. CETESB, São Paulo.
- Fletcher A., Gilbert O.L., Clayden S., and Fryday A.M. (2009). *Rhizocarpon* Ramond ex DC. (1805). [In:] *The lichens of Great Britain and Ireland*. (C.W. Smith, A. Aptroot, B.J. Coppins, A. Fletcher, O.L. Gilbert, P.W. James and P.A. Wolseley, Eds.): 792-888. British Lichen Society. London.
- Frøberg L., Björn L.O., Baur A., Baur B. (2001). Viability of lichen photobionts after passing through the digestive tract of a land snail. *The Lichenologist* **33**: 543-550.
- Friedl T. (1989). Comparative ultrastructure of pyrenoids in *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta). *Plant Systematics and Evolution* **164**: 145-159.
- Fries Th. M. (1874). *Lichenographia Scandinavica II*. Upsaliae.
- Fryday AM. (1996). A provisional re-assessment of the non-yellow species of *Rhizocarpon* occurring in the British Isles. *British Lichen Society Bulletin* **78**: 29-40.
- Fryday AM. (2000). On *Rhizocarpon obscuratum* (Ach.) Massal., with notes on some related species in the British Isles. *The Lichenologist* **32**: 207-224.
- Gagunashvili A.N., Davidsson S.P., Jónsson Z.O., Andrússon O.S. (2009). Cloning and heterologous transcription of a polyketide synthase gene from the lichen *Solorina crocea*. *Mycological Research* **113**: 354-363.
- Galloway D.J., Aptroot A. (1995). Bipolar lichens: a review. *Cryptogamic Botany* **5** (2): 184-191.
- Galloway D. (2008). Lichen biogeography. 315-335 pp. [In:] *Lichen Biology*. (T. H. Nash, Ed.). Cambridge University Press. Cambridge, GB.
- Galloway D.J. (2007). *Flora of New Zealand Lichens. Lichens, including lichen-forming and lichenicolous fungi*. Revised second edition.2. Lincoln, Manaaki Whenua Press.
- Galun M., Bubrick P. (1984). Physiological interactions between partners of the lichen symbiosis. [In:] *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Volume 17. Cellular Interactions (H.F. Linskens & J. Heslop-Harrison, Eds): 362-401. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Gardes M., Bruns T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology* **2**: 113-118.
- Gargas A., DePriest P.T., Grube M., Tehler A. (1995). Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* **268** (5216): 1492-1495.
- Gómez-Bolea A., Barbero M., Hladun N.L., Navarro-Rosinés P., Giralto M. *et al.* (2000). Lliquens i fongs liquenícolas de la Reserva Integral d'Aiguestortes i estany de Sant Maurici-Pirineus, Espanya. V *Jornades sobre Reaçça al Parc Nacional d'Aiguestortes i Estany de Sant Maurici*. 73-80. (Flora, L).
- Goudie A.S. (2006). Global warming and fluvial geomorphology. *Geomorphology* **79** (3-4): 384-394.

- Gueidan C., Savić S., Thüs H., Roux C., Keller C., *et al.* (2009). Generic classification of the *Verrucariaceae* (Ascomycota) based on molecular and morphological evidence: recent progress and remaining challenges. *Taxon* **59** (1):184-208.
- Guiry M.D., Guiry G.M. (2013). **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. www.algaebase.org.
- Green T.G.A., Sancho L.G., Türk R., Seppelt R.D., Hogg I.D. (2011). High diversity of lichens at 84° S, Queen Maud Mountains, suggests preglacial survival of species in the Ross Sea region, Antarctica. *Polar Biology* **34**: 1211-1220.
- Grube M., Kroken S. (2000). Molecular approaches and the concept of species and species complex in lichenized fungi. *Mycological Research* **104** (11): 1284-1294.
- Grube M., Blaha J., (2003). On the phylogeny of some polyketide synthase genes in the lichenized genus *Lecanora*. *Mycological Research* **107** (12): 1419-1426.
- Grube M., Baloch E., Lumbsch H.T. (2004). The phylogeny of *Porinaceae* (Ostropomycetidae) suggests a neotenic origin of perithecia in Lecanoromycetes. *Mycological Research* **108** (10): 1111-1118.
- Grube M., Hawksworth D.L. (2007). Trouble with lichen: the re-evaluation and re-interpretation of thallus form and fruit body types in the molecular era. *Mycological Research* **111**: 1121-1137.
- Grundt H.H., Kjolner S., Borgen L., Rieseberg L.H., Brochmann C. (2006). High biological species diversity in the arctic flora. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* (PNAS) **103**: 972-975.
- Guzow-Krzeminska B. (2006). Photobiont flexibility in the lichen *Protoparmeliopsis muralis* as revealed by ITS rDNA analyses. *The Lichenologist* **38**(5): 469-476.
- Hafellner J. (1984). Studien in Richtung einer natürlichen Gliederung der Sammelfamilien *Lecanoraceae* und *Lecideaceae*. [In:] *Hertel Beiheft zur Nova Hedwigia* **79**: 241-371.
- Halle M.E. (1983). *The Biology of Lichens*. Contemporary Biology Series, Arnold, London.
- Hall T.A. (1999). Bioedit. *Department of Microbiology, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA*.
- Hall B.G. (2008). *Phylogenetic trees made easy. A how-to manual*. 3rd Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hansen E.S., Dawes P.R., Thomassen B. (2006). Epilithic Lichen Communities in High Arctic Greenland: Physical, Environmental, and Geological Aspects of Their Ecology in Inglefield Land (78°-79°N). *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* **38** (1): 72-81.
- Hart M., Sunday J. (2007). Things fall apart: biological species form unconnected parsimony networks. *Biology Letters* **3**: 509-512.
- Hauck M., Helms G., Friedl T. (2007). Photobiont selectivity in the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*. *The Lichenologist* **39**: 195–204.
- Hawksworth D.L., Sowter F.A. (1969). Leicestershire and Rutland lichens, 1950-1969. *Transactions of the Leicestershire literary and philosophical society* **63**: 50-61.
- Hawksworth D.L., Honegger R. (1994). The lichen thallus: a symbiotic phenotype of nutritionally specialized fungi and its response to gall producers. [In:] *Plant Galls: Organisms, Interactions, Populations*. (M.A.J. Williams, Ed.) : 77-98. Clarendon Press, Oxford.
- Hawksworth D. L., Kirk P. M., Sutton B. C., Pegler D. N. (1995). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of Fungi*. 8th ed. CAB International, Wallingford.
- Hedenås H., Bolyukh V.O., Jonsson B.G. (2003). Spatial distribution of epiphytes on *Populus tremula* in relation to dispersal mode. *Journal of Vegetation Science* **14** (2): 233-242.
- Helms G. (2003). Taxonomy and Symbiosis in Associations of *Physciaceae* and *Trebouxia*. Tesis Doctoral. Universität Göttingen. Göttingen. Alemania.
- Helms G., Friedl T., Rambold G., Mayrhofer H. (2001). Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. *The Lichenologist* **33**: 73-86.
- Hendry A.P. (2009). *Speciation*. *Nature* **458**: 162.
- Hertel H. (1971). Beiträge zur Kenntnis der Flechtenfamilie Lecideaceae, IV, *Herzogia* **2**: 231-261.
- Hertel H. (1987). Bemerkenswerte Funde südhemisphärischer, saxicoler Arten der Sammelgattung *Lecidea*. *Mitteilungen der Botanischen Staassammlung München* **23**: 312-340.
- Hertel H., Ullrich H. (1976). Flechten von Amsterdamöya (Svalbard). *Mitteilungen der Botanischen Staassammlung München* **12**: 417-512.
- Hestmark G., Miadlikowska J., Kauff F., Fraker E., Molnar K. *et al.* (2011). Single origin and subsequent diversification of central Andean endemic Umbilicaria species. *Mycologia* **103** (1): 45-56.
- Hladun N., Llimona X. (2002-2007). Checklist of the Lichens and lichenicolous Fungi of the Iberian Peninsula and Balearic Islands. <http://botanica.bio.ub.es/checklist/checklist.htm>
- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., *et al.* (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* **111**: 509-547.
- Honegger R. (1979). Ascocarponogenie, Ascusstruktur und -funktion bei Vertretern der Gattung *Rhizocarpon*. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **91**: 579-594.
- Honegger R. (1980). The ascus apex in lichenized fungi II. The *Rhizocarpon*-type. *The Lichenologist* **12** (2): 157-172.
- Honegger R. (1982). Ascus structure and function, ascospore delimitation, and phycobiont cell wall types associated with the Lecanorales (lichenized, Ascomycetes). *Journal of the Hattori Botanical laboratory* **52**: 417-429.
- Honegger R., Zippler U., Gansner H., Scherrer S. (2004). Mating systems in the genus *Xanthoria* (lichen-forming ascomycetes). *Mycological Research* **108** (5): 480-488.
- Honegger R., Zippler U. (2007). Mating systems in representatives of *Parmeliaceae*, *Ramalinaceae* and *Physciaceae* (Lecanoromycetes, lichen-forming ascomycetes). *Mycological Research* **111**: 424-432.

- Hofstetter V., Miadlikowska J., Kauff F., Lutzoni F. (2007). Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: a case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Molecular phylogenetics and evolution* **44** (1): 412-426.
- Hue A.M. (1915) 2me Exp. Antarct. Franç. Lich. 171.
- Huelsenbeck J.P., Rannala B., Masly J.P. (2000). Accommodating phylogenetic uncertainty in evolutionary studies. *Science* **288**: 2349-2350.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**: 754-755.
- Huelsenbeck J.P., Larget B., Van der Mark P., Ronquist F., Simon D. (2006). Mrbayes: Bayesian inference of phylogeny, version 3.1.2. <http://mrbayes.csit.fsu.edu/> (distributed by the authors).
- Hughes K.A., Ott S., Bölter M., Convey P. (2006). Colonisation Processes. [In:] *Trends in Antarctic Terrestrial and Limnetic Ecosystems Antarctica as a Global Indicator*. (D.M. Bergstrom, P. Convey, A.H.L. Huiskes, Eds.): 35-54.
- Ihlen P.G., Ekman S. (2002). Outline of phylogeny and character evolution in *Rhizocarpon* (Rhizocarpaceae, lichenized Ascomycota) based on nuclear its and mitochondrial SSU ribosomal DNA sequences. *Biological journal of the Linnean Society* **77**: 535-546.
- Innes J.L. (1981). A Manual for Lichenometry -Comment. *Area* **13**: 237-241.
- Innes J.L. (1985). Lichenometry. *Progress in Physical Geography* **9**: 187.
- Innes J.L. (1986). The size-frequency distributions of the lichens *Sporastatia testudinea* and *Rhizocarpon alpicola* through time at Storbreen, south-west Norway. *Journal of Biogeography* **13**: 283-291.
- Jackson A. P., Vaughan S., Gull, K. (2006). Comparative genomics and concerted evolution of β -tubulin paralogs in *Leishmania* spp. *BMC Genomics* **7**: 137-149.
- James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V. *et al.* (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443** (7113): 818-822.
- Jatta A. (1880). Lichenum Italiae meridionalis manipulus tertius, quem collegit et ordinavit. *Nuovo Giornale Botanico italiano*. **12**: 199-242.
- Jiries A.G., Batarseh M.I., El-Hassen T., Ziadat A.H., Al-Nasir F. *et al.* (2008). Lichens (*Rhizocarpon geographicum* (L.) DC) as a Biomonitor for Atmospheric Pollution in Amman City, Jordan. *Environmental Bioindicators* **3** (2): 106-113.
- Jomelli V., Grancher, D., Brunstein, D., Solomina, O., (2008). Recalibration of the yellow *Rhizocarpon* growth curve in the cordillera Blanca (Peru) and implications for LIA chronology. *Geomorfology* **93**: 201-212.
- John E. (1989). Note on the sizes of largest thalli of three species of *Rhizocarpon* (Subgenus *Rhizocarpon*) at a Rockslide in the Canadian Rocky Mountains. *Arctic and Alpine Research* **21** (2): 185-187.
- John E., Dale M.R.T. (1989). Niche relationship amongst *Rhizocarpon* species at Jonas Rockslide, Alberta, Canada. *The Lichenologist* **21** (4): 313-330.
- Jukes T.H., Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. [In:] *Mammalian protein metabolism*. (H.N. Munro, Ed.): 21-123. New York Academic Press.
- Kappen L., Straka H. (1988). Pollen and spores transport into the Antarctic. *Polar Biology* **8**: 173-180.
- Kawahata M., Fujii T., Iefuji H., (2007). Intraspecies diversity of the industrial yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* based on analysis of the sequences of the internal transcriber spacer (ITS) regions and the D1/D2 region of 26 S rDNA. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **71** (7): 1616-1620.
- Kirk P. M. (2000-2012). Index Fungorum. CABI. Bio Science data base. www.indexfungorum.org.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C. and Stalpers J.A. (2001). Dictionary of Fungi. 9th Edition. CABI Bioscience Publishing.
- Kim J.B., Ahn I-Y., Lee K.S., Chung H., Choi H-G. (2007). Vegetation of Barton Peninsula in the neighbourhood of King Sejong Station (King George Island, maritime Antarctic). *Polar Biology* **30**:903-916.
- Kleywegt G.J. (1992-2005). Uppsala University, Uppsala, Sweden. Uppsala Software Factory. [Http://xray.bmc.uu.se/usf](http://xray.bmc.uu.se/usf).
- Knowles L.L., Carstens B.C. (2007). Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology* **56** (6): 887-895.
- Kroken S., Taylor J.W. (2000). Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *The Bryologist* **103**: 645-660.
- Lamarck J.B., De Candolle A. P. (1805). *Flore Française*. Ed. III. Tomo II: 365-366.
- Lamb I.M. (1948). Further data on the genus *Neuropogon*. *Lilloa* **14**: 139-168.
- Larget B., Simon D. (1999). Markov Chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetics trees. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 750-759.
- Lawrence G.H.M., Buchheim A.F.G., Daniels G.S., Dolezal H. (1968). B-H-P *Botanico-Periodicum-Huntianum*. Hunt Botanical Library, Pittsburgh, Pa.
- Leavitt S.D., Frankhauser J.D., Leavitt D.H., Porter L.D., Johnson L.A. *et al.* (2011a). Complex patterns of speciation in cosmopolitan "rock posy" lichens - Discovering and delimiting cryptic fungal species in the lichen-forming *Rhizoplaca melanophthalma* species-complex (Lecanoraceae, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **59**: 587-602.
- Leavitt S.D., Johnson L., Larry L., St. Clair L. L. (2011b). Species delimitation and evolution in morphologically and chemically diverse communities of the lichen-forming genus *Xanthoparmelia* (Parmeliaceae, Ascomycota) in Western North America. *American Journal of Botany* **98** (2): 175-188.
- Lefebure T., Douady C.J., Gouy M., Trontelj P., Briolay J., Gibert J. (2006). Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology* **15**: 1797-1806.

- Librado P., Rozas J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- Linneo C. (1753). *Species Plantarum*. Tomo II: 1140-1141. Holmiae.
- Llimona X., Wirth W., Dull R. (2004). *Guía de campo de los líquenes, musgos y hepáticas*. Ed. Omega.
- Lohézic-Le Dévéhat F., Tomasi T., Elix J.A., Bernard A., Roauaud I. *et al.* (2007). Stictic Acid Derivates from the lichen *Usnea articulata* and Their Antioxidant Activities. *Journal of Natural Products* **70**: 1218-1220.
- Lohtander K., Myllys L., Sundin R., Hällersjö M., Tehler A. (1998). The species pair concept in the lichen *Dendrographa leucophaea* (Arthoniales): analyses based on ITS sequences. *The Bryologist* **101**: 404-411.
- Lücking R., Lumbsch H.T., Di Stéfano J.F., Lizano D., Carranza J. *et al.* (2008). *Eremithallus costaricensis* (Ascomycota: Lichinomycetes: Eremithallales), a new fungal lineage with a novel lichen symbiotic lifestyle discovered in an urban relict forest in Costa Rica. *Symbiosis* **46**: 161-170.
- Lücking R., Lawrey J.D., Sikaroodi M., Gillevet P.M., Chaves J.L. *et al.* (2009). Do lichens domesticate photobionts like farmers domesticate crops? Evidence from a previously unrecognized lineage of filamentous cyanobacteria. *American Journal of Botany* **96** (8): 1409-1418.
- Lumbsch H. T. (1998). The use of metabolic data in lichenology at the species and subspecific levels. *The Lichenologist* **30** (4-5): 357-367.
- Lumbsch H. T., Huhndorf S.M. (2010). Outline of Ascomycota - 2009. *Myconet* **14**: 1-42.
- Lumbsch H. T., Leavitt S.D. (2011). Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity* **50** (1): 59-72.
- Lumbsch H.T., Wirtz N. (2011). Phylogenetic relationships of the Neuropogonoid core group in the genus *Usnea* (Ascomycota: Parmeliaceae). *The Lichenologist* **43** (6): 553-559.
- Lutzoni F., Kauff F., Cox C. J., McLaughlin D., Celio G. *et al.* (2004). Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* **91**: 1446-1480.
- Lumbsch H. T., Schmitt I., Lücking R., Wiklund E., Wedin M. (2007). The phylogenetic placement of Ostropales within *Lecanoromycetes* (Ascomycota) revisited. *Mycological Research* **111**: 257-267.
- Lumbsch H.T., Mangold A., Martín M.P., Elix J.A. (2008). Species recognition and phylogeny of *Thelotrema* species in Australia (Ostropales, Ascomycota). *Australian Systematic Botany* **21**: 217-227.
- Lynch M., Crease T.J. (1990). The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution* **7**: 377-394.
- Lyngé B. (1928). *Lichens from Novaya Zemlya. Report of the scientific results of the Norw. exp. to Novaya Zemlya 1921* (43). Oslo.
- Lyngé B. (1932). A revision of the genus *Rhizocarpon* (Ram.) Th. Fr. in Greenland. *Skrifter om Svalbard og Ishavet* **47**: 1-30.
- Lyngé B. (1936). The lichen genus *Rhizocarpon* on the west and north coast of Spits-Bergen and ordostlandet (The North East Land). *Svensk Botanisk Tidskrift*. Bd. 30, H. 3.
- Magnuson A. H. (1948). New or otherwise interesting Swedish lichens. *Botaniska Notiser* **101**. Lund Botanical Society.
- Mangold A., Martín M.P., Lücking R., Lumbsch H.T. (2008). Molecular phylogeny suggests synonymy of Thelotremataceae within Graphidaceae (Ascomycota: Ostropales). *Taxon* **57** (2): 476-486.
- Martínez-Lage A., Insua A. (1997). El genoma de los moluscos bivalvos: aspectos moleculares y evolutivos. III Simposio de Científico en Biología Celular y Molecular: Organización y evolución del genoma eucariota: marcadores moleculares: 85- 97. Universidad da Coruña. Servicio de Publicaciones.
- Matheny P.B., Liu Y.J., Ammirati J.F., Hall B.D. (2002). Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (*Inocybe*, Agaricales). *American Journal of Botany* **89** (4): 688-698.
- Mayden R.L. (1997). A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem.[In:] *Species: the Units of Biodiversity* (M.F. Claridge, H.A. Dawah and M.R. Wilson, Eds.): 381-424. Chapman and Hall, London.
- Mayr E. (1963). *Animal Species and Evolution*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Mayr E. (1992). Species concepts and their application. [In:] *The Units of Evolution* (M. Ereshefsky, Ed.): 15-25. Cambridge, MA: The MIT Press.
- Meier F.A., Scherrer S., Honegger R. (2002). Faecal pellets of lichenivorous mites contain viable cells of the lichen-forming ascomycete *Xanthoria parietina* and its green algal photobiont, *Tebouxia arboricola*. *Biological Journal of the Linnean Society* **76**: 259-268.
- Meier W., Stroeve J., Fetterer F., Knowles K. (2005). Reductions in Arctic sea ice cover no longer limited to summer. *EOS, Transactions of the American Geophysical Union* **86**: 326.
- Menéndez J., Cerdán E., Rodríguez-Torres A., Martínez A. (1997). Organización y evolución del genoma eucariota: marcadores moleculares. III Simposio de Biología celular y molecular. Servicio de Publicacións, Universidade da Coruña, Colección cursos, congresos e simposios 30.
- Menéndez J., González-Tizón A. (1997). Los genomas eucariotas: Aspectos generales. III Simposio de Biología celular y molecular. Servicio de Publicacións, Universidade da Coruña, Colección cursos, congresos e simposios 30, pag 13.
- Miadlikowska J., Kauff F., Hofstetter V., Fraker E., Reeb V. *et al.* (2006). New insights into classification and evolution of the Lecanoromycetes (Pezizomycotina, Ascomycota) from phylogenetic analyses of three ribosomal RNA- and two protein-coding genes. *Mycologia* **98**: 1089-1102.
- Mietzsch E., Lumbsch H.T., Elix J.A. (1994). *Wintabolites (Mactabolites for windows) Users Manual 2nd Ed.* Essen: Universität Essen.
- Mishler B. D. (1985). The morphological, developmental, and phylogenetic basis of species concepts in bryophytes. *The Bryologist* **88**: 207-214.

- Molina M.C., Divakar P. K., Millanes A. M., Sánchez E., Del-Prado R., *et al.* (2011). *Parmelia sulcata* (Ascomycota: Parmeliaceae), a sympatric monophyletic species complex. *The Lichenologist* **43** (6): 585-601.
- Muggia L., Grube M., Tretiach M. (2008). A combined molecular and morphological approach to species delimitation in black-fruited, endolithic Caloplaca: high genetic and low morphological diversity. *Mycological Research* **112**: 36-49.
- Muggia L., Zellnig G., Rabensteiner J., Grube M. (2010). Morphological and phylogenetic study of algal partners associated with the lichen-forming fungus *Tephromela atra* from the Mediterranean region. *Symbiosis* **51**: 149-160.
- Muñoz J., Felicísimo A.M., Cabezas F., Burgaz A.R., Martínez, I. (2004) Wind as a long-distance dispersal vehicle in the Southern Hemisphere. *Science* **304**, 1144–1147.
- Murtagh G. J., Dyer P. S., McClure P. C., Crittenden, P. D. (1999). Use of randomly amplified polymorphic DNA markers as a tool to study variation in lichen-forming fungi. *The Lichenologist* **31** (3): 257-267.
- Murtagh G. J., Dyer P. S., Crittenden P. D. (2000) Sex and the single lichen. *Nature* **404**: 564.
- Myllys L., Lohtander K., Hällersjö M., Tehler A. (1999). Sequences insertions and ITS data provide congruent information on *Rocella canariensis* and *R. tuberculata* (Arthoniales, Euascomycetes) phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **12**: 295-309.
- Nash T. H., Boucher V. L., Gebauer R., Larson D. W. (1990). Morphological and physiological plasticity in *Ramalina menziesii*: studies with reciprocal transplants between a coastal and inland site. [In:] *Contributions to Lichenology in Honour of A. Henssen* (H. M. Jahns, Ed.). *Bibliotheca Lichenologica* **38**: 357-65. Berlin-Stuttgart. J. Cramer.
- Nash T.H. (1996). *Lichen Biology*. Cambridge University Press.
- Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
- Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P.A., (2002). Monitoring with Lichens-Monitoring Lichens. *Nato Science Series* **7**.
- Nimis P.L., Martellos S. (2008). *ITALIC - The Information System on Italian Lichens*. Version 4.0. University of Trieste, Dept. of Biology, IN4.0/1 (<http://dbiodbs.univ.trieste.it/>).
- Nevo E. (2001). Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* (PNAS) **98**: 6233-6240.
- Norman J. M. (1853). *Nyt magasin for natururvidenskaberne* **7**.
- Nyati S., Beck A., Honegger R. (2007). Fine structure and phylogeny of green algal photobionts in the microfilamentous genus *Psoroglaena* (Verrucariaceae, lichen-forming ascomycetes). *Plant Biology* **9**: 390-399.
- Nylander W. (1865). *Addenda nova ad Lichenographiam Europaeam*. Flora 47. Regensburg.
- Nylander W. (1881). *Addenda nova ad Lichenographiam Europaeam*. Flora 64. Regensburg.
- Nylander W. (1884). *Lichenes novi e Freto Behringii*. Flora 67. Regensburg.
- Nylander J.A., Wilgenbusch J.C., Warren D.L., Swofford D.L. (2007). AWTY (Are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics* **24**: 581-583.
- Núñez-Zapata J., Divakar P.K., del Prado R., Cubas P., Hawksworth D.L. *et al.* (2011). Conundrums in species concepts: the discovery of a new cryptic species segregated from *Parmelina tiliacea* (Ascomycota: Parmeliaceae). *The Lichenologist* **43** (6): 603-616.
- O'Brien H.E., Miadlikowska J., Lutzoni F. (2005). Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera*. *European Journal of Phycology* **40**: 363-378.
- O'Brien H.E., Miadlikowska J., Lutzoni F. (2009). Assessing reproductive isolation in highly diverse communities of the lichen-forming fungal genus *Peltigera*. *Evolution* **63**: 2076-2086.
- Ohmura Y., Kawachi M., Kasai F., Watanabe M.M., Takeshita S. (2006). Genetic combinations of symbionts in a vegetatively reproducing lichen, *Parmotrema tinctorum*, based on ITS rDNA sequences. *The Bryologist* **109** (1): 43-59.
- Orange A., James P.W., White F.J. (2001). *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. British Lichen Society.
- Opanowicz M., Blaha J., Grube M. (2006). Detection of paralogous polyketide synthase genes in *Parmeliaceae* by specific primers. *The Lichenologist* **38** (1): 47-54.
- Otálora M.A.G. (2008). Estudio filogenético de los líquenes de la familia Collemataceae y los patrones de selectividad con su cianobionte. Tesis Doctoral. Universidad Rey Juan Carlos. Madrid. España.
- Otálora M.A.G., Martínez I., Aragón G., Molina M.C. (2010). Phylogeography and divergence date estimates of a lichen species complex with a disjunct distribution pattern. *American Journal of Botany* **97** (2): 216-223.
- Ott S. (1987). Sexual reproduction and developmental adaptations in *Xanthoria parietina*. *Nordic Journal of Botany* **7**: 219-228.
- Ott S., Brinkmann M., Wirtz N., Lumbsch H.T. (2004). Mitochondrial and nuclear ribosomal DNA data do not support the separation of the Antarctic lichens. *The Lichenologist* **36** (3-4): 227-234.
- Øvstedal D. O., Smith L. (2001). *Lichens of Antarctica and South Georgia*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Ozenda P., Clauzade G. (1970). *Les Lichens, Étude Biologique et Flore Illustrée*. Masson. Paris. 421-434.
- Page R.D.M. (1996). Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computational Applied Biosciences* **12**: 357-358.
- Peksa O., Škaloud P. (2011). Do photobionts influence the ecology of lichens? A case study of environmental preferences in symbiotic green alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae). *Molecular Ecology* **20**: 3936-3948.

- Pérez-Ortega S., de los Ríos A., Crespo A., Sancho L.G. (2010a). Symbiotic lifestyle and phylogenetic relationships of the bionts of *Mastodia tessellata* (Ascomycota, *incertae sedis*). *American Journal of Botany* **97** (5): 738-752.
- Pérez-Ortega S., Spribille T., Palice Z., Elix J.A., Printzen C. (2010b). A molecular phylogeny of the *Lecanora varia* group, including a new species from western North America. *Mycological Progress* **9**: 523-535.
- Pérez-Ortega S., Ortiz-Álvarez R., Green T.G.A., De los Ríos A. (2012). Lichen myco- and photobiont diversity and their relationships at the edge of life (McMurdo Dry Valleys, Antarctica). *Microbiology Ecology* **82**: 429-448.
- Peveling E. (1977). Die Ultrastruktur einiger Flechten nach langen Trockenzeiten. *Protoplasma* **92** (1-2): 129-136.
- Pfenninger M., Schwenk K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 121.
- Piercey-Normore M.D. (2006). The lichen-forming ascomycete *Evernia mesomorpha* associates with multiple genotypes of *Trebouxia jamesii*. *New Phytologist* **169**: 331-344.
- Piercey-Normore M.D. (2009). Vegetatively reproducing fungi in three genera of the *Parmeliaceae* show divergent algal partners. *The Bryologist* **112**: 773-785.
- Pigliucci M. (2001). *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture*. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Pino-Bodas R., Burgaz A.R., Martín M.P., Lumbsch H.T. (2011) Species delimitations in the *Cladonia cariosa* group (*Cladoniaceae*, Ascomycota). *The Lichenologist* **44** (1): 121-135.
- Pino-Bodas
- Pintado A., Valladares F., Sancho L.G. (1997). Exploring phenotypic plasticity in the lichen *Ramalina capitata*: morphology, water relations and chlorophyll content in Northand South-facing populations. *Annals of Botany* **80**: 345-353.
- Poczaí P., Hyvönen E. (2010). Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Molecular Biology Reports* **37** (4): 1897-1912.
- Poelt J. (1970). Mitteleuropäische Flechten IX. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* **8**: 191-210.
- Poelt J. (1988). *Rhizocarpon* Ram. em. Th. Fr. subgen. *Rhizocarpon* in Europe. *Arctic and Alpine Research* **20** (3): 292-298.
- Poelt J. (1990). Parasitische Arten der Flechtengattung *Rhizocarpon* – eine weitere Übersicht. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* **29**: 515-538.
- Poelt J., Vězda A. (1977). Bestimmungsschlüssel Europäischer Flechten. Ergänzungsheft I. *Bibliotheca Lichenologica* **9**. Vaduz: J. Cramer.
- Poelt J., Vězda A. (1980). *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. ssp. *diabasicum* (Räs) Poelt & Vězda comb. nov. [In:] *Checklist of British lichen-forming, lichenicolous and allied fungi*. (D.L. Hawksworth, P.W. James, B.J. Coppins, Eds.). *The Lichenologist* **12** (1): 1-116.
- Porter S.C. (1981). Lichenometric studies in the Cascade Range of Washington: establishment of *Rhizocarpon geographicum* growth curves at Mount Rainier. *Arctic and Alpine Research* **13**: 11-23.
- Posada D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253-1256.
- Printzen C. (1999). The lichen genus *Biatora* in northwestern North America. *The Bryologist* **102** (4): 692-713.
- Printzen C. (2002). Fungal specific primers for PCR amplification of mitochondrial LSU in lichens. *Molecular Ecology Notes* **2**: 130-132.
- Printzen C. (2010). Lichen Systematics: The Role of Morphological and Molecular Data to Reconstruct Phylogenetic Relationships. *Progress in Botany* **71** (4): 233-275.
- Proctor M.C.F. (1983). Sizes and growth of thalli of the lichen *Rhizocarpon geographicum* on the moraines of the glacier de Valsorey, Valais, Switzerland. *The Lichenologist* **15** (3): 249-261.
- Purvis O. W., James P. W., Holtan-Hartwig J., Timdal E., Clayden S. C. (1992). *Rhizocarpon* Lam. ex DC. (1805). [En:] *The Lichen Flora of Great Britain and Ireland* (O. W. Purvis, B. J. Coppins, D.L. Hawksworth, P. W. James & D.M. Moore eds.): 531-542. Natural History Museum Publications, London.
- Purvis O. W. (1997). The species concept in lichens. [En:] *Species. The units of biodiversity*. (M.F. Claridge, H.A. Dawah and M.R. Wilson eds.): 109-134. London: Chapman & Hall.
- Rabatel A., Francou S., Jomelli V., Naveau P., Grancher D. (2008). A chronology of the Little Ice Age in the tropical Andes of Bolivia (16°S) and its implications for climate reconstruction. *Quaternary Research* **70** 198-212.
- Raggio P. (2013). Fotosíntesis, crecimiento y resistencia a ambientes extremos en líquenes de regiones polares y alpinas. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. UCM. Madrid.
- Rambaut A. y Drummond A.J. (2003). Tracer [computer program]. Available from website <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Rambold G., Meier C., Thamerus M. (1998). A comparative study on structure and functionality of asci in species of *Rhizocarpon* (Lecanorales, Ascomycetes). *Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie* **19**: 247-225.
- Räsänen V. (1942a). *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. und ihre Verwandten in Finnland. *Annales botanici Societatis Zoologicae Botanicae Fennicae "Vanamo"* **16**.
- Räsänen V. (1942b). Zur Kenntnis der Flechtengattung *Rhizocarpon* I y II. *Revista Sudamericana de Botánica* **7**: 77-92.
- Räsänen V. (1943a). Bestimmungsschlüssel für die gelben *Rhizocarpon*-Arten, Varietäten und Formen. *Feddes repertorium specierum novarum regni vegetabilis* **52**: 127-136.
- Räsänen V. (1943b). Novae et minime notae species et variationes ex genere *Rhizocarpon* (Ram.) Th. Fr. *Feddes repertorium specierum novarum regni vegetabilis* **52**: 136-143.
- Räsänen V. (1943c). Das system der flechten. *Acta Botanica Fennica* **33**. Helsingforsiae.

- Räsänen V. (1944). Iterum novae quaedam species, variationes, formae flavae ex genere *Rhizocarpon* (Ram.) Th. Fr. *Annales botanici Societatis Zoologicae Botanicae Fennicae "Vanamo"* **19**.
- Räsänen V. (1947). Lichenes novi II. *Annales botanici Societatis Zoologicae Botanicae Fennicae "Vanamo"* **21**. Helsinki.
- Räsänen V. (1949a). Preliminary studies on the yellow species of *Rhizocarpon*. *Kuopion Luonon Ystävain Yhdistyksen julkaisuja*, sarja B **2**: 4. Kuopio.
- Räsänen V. (1949b). Lichenes Novi IV. *Annales botanici Societatis Zoologicae Botanicae Fennicae "Vanamo"* **III**. Helsinki.
- Räsänen V. (1951). Suomen Jäkäläkasvio. *Kuopion Luonon Ystävain Yhdistyksen julkaisuja*, sarja A **5**. Kuopio.
- Ray J. (1686). *Historia Plantarum*. Volumen 1. Clark, London
- Rebentisch, J. F. (1804). *Prodromus florae neomarchicae*. Berolini.
- Redchenko O., Vondrák J., Košnar J. (2012). The oldest sequenced fungal herbarium sample. *The Lichenologist* **44** (5): 715-718.
- Reeb V., Lutzoni F., Roux C. (2004). Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 1036-1060.
- Rico V.J. (1983). *Líquenes de los pisos oro- y criomediterráneo del Pico del Lobo (Sierra de Ayllón, Segovia)*. Memoria de Licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid.
- Rignot E., Velicogna I., Van den Broeke M. R., Monaghan A., Lenaerts J. (2011). Acceleration of the contribution of the Greenland and Antarctic ice sheets to sea level rise. *Geophysical Research Letters*, **38** (5), L05503.
- Rikkinen J. (1997). Habitat shifts and morphological variation of *Pseudevernia furfuracea* along a topographical gradient. *Symbolae Botanicae Upsaliensis* **32**: 223-245.
- Rivas-Martínez S. (1987). *Memoria del mapa de series de vegetación de España*. Serie Técnica nº 1: 9-208. I.C.O.N.A. Madrid.
- Rivas-Martínez S. (2010). Sinopsis bioclimática de las Tierra y mapas bioclimáticos de Suramérica. *Lecturas singulares* 10. Real Academia Nacional de Farmacia.
- Robert V., Stegehuis J., Stalpers J. (2005). The Mycobank engine and related database. <http://www.mycobank.org>
- Rodríguez F., Oliver J. L., Marin A., Medina J. R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* **142**: 485-501.
- Romão P.M.S., Rattazzi A. (1996) Biodeterioration on Megalithic Monuments. Study of Lichens' Colonization on TapadHo and Zambujeiro Dolmens (Southern Portugal). *International Biodeterioration & Biodegradation* **23-35**
- Romeike J., Friedl T., Helms G., Ott S. (2002). Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (lichenized ascomycetes) along a transect of the Antarctic Peninsula. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 1209-1217.
- Rozen S., Skaletsky H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. [In:] *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. (S. Krawetz, S. Misener, Eds.): 365-386. Humana Press, Totowa, NJ.
- Runemark H. (1956a). Studies in *Rhizocarpon* I. Taxonomy of the yellow species in Europe. *Opera Botanica* **2** (1): 152.
- Runemark H. (1956b). Studies in *Rhizocarpon* II. Distribution and Ecology of the yellow species in Europe. *Opera Botanica* **2** (2): 150.
- Rojas-Fernández J.A., Balza-Quintero A., Marcano V., Rojas P.A., Dávila-Vera D. et al. (2008). Metabolitos secundarios de líquenes de la zona nival de la Sierra Nevada de Mérida-Venezuela y su papel en la absorción de la radiación ultravioleta. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **65**(1): 59-72.
- Rosen D. E. (1979). Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **162**: 267-376.
- Ruiz-Sánchez E., Sosa V. (2010). Delimiting species boundaries within the Neotropical bamboo *Oatea* (Poaceae: Bambusoideae) using molecular, morphological and ecological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**:344-356.
- Saint-Hilaire, J. H. J. (1808). *Plantes de la France: décrites et peintes d'après nature*. Vol. 1. chez l'auteur.
- Sancho L.G. (1986). Flora y Vegetación líquénica saxícola de los pisos oro- y crio-mediterráneo del Sistema Central Español. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.
- Sancho L.G., Valladares F. (1993). Lichen colonization of recent moraines on Livingston Island (South Shetland I., Antarctica). *Polar Biology* **13**: 227-233.
- Sancho L.G., Pintado A. (2004). Evidence of high annual growth rate for lichens in the maritime Antarctic. *Polar Biology* **27**: 312-319.
- Sancho L. G., Valladares F., Schroeter B., Kappen L. (2000). Ecophysiology of Antarctic versus temperate populations of a bipolar lichen: the key role of the photosynthetic partner. [In:] *Antarctic Ecosystems: models for wider ecological understanding* (W. Davison, C. Howard-Williams & P. Broady, Eds.): 190-194. Caxton Press, Christchurch, NZ.
- Sancho L.G., Palacios D., de Marcos J., Valladares F. (2001). Geomorphological significance of lichen colonization in a present snow hollow: Hoya del Cuchillar de las Navajas, Sierra de Gredos (Spain). *Catena* **43** (4): 323-340
- Sancho L.G., Green A.T.G., Pintado A. (2007a). Slowest to fastest: Extreme range in lichen growth rates supports their use as an indicator of climate change in Antarctica. *Flora* **667-673**.

- Sancho L. G., de la Torre Noetzel R., Horneck G., Ascaso C., de los Ríos A. *et al.* (2007b). Lichens survive in space: Results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology* **7** (3): 443-454.
- Sancho L. G., Palacios D., Green A.T.G., Vivas M., Pintado A. (2011). Extreme high lichen growth rates in recently deglaciated areas in Tierra del Fuego. *Polar Biology* **34** (6): 813-822.
- Schaerer L. E. (1823-1846). *Lichenes Helveticorum Spicilegium*. 2 vols.
- Schmitt I., Lumbsch H.T. (2004). Molecular phylogeny of the *Pertusariaceae* supports secondary chemistry as an important systematic character set in lichen-forming ascomycetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33**: 43-55.
- Schmitt I., Martin M., Kautz S., Lumbsch T. (2005). Diversity and evolution of secondary metabolite encoding genes in the *Pertusariaceae*. *Phytochemistry* **66**: 1241-1253.
- Schmitt I., Crespo A., Divakar P.K., Fankhauser J. D., Herman-Sackett E. *et al.* (2009). New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenies and systematics. *Persoonia* **23**: 35-40.
- Schoch C.L., Sung G-H, López-Giráldez F., Townsend J.P., Miadlikowska J. *et al.* (2009). The Ascomycota Tree of Life: A phylum wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology* **58**: 224-239.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L. *et al.* (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* (PNAS) **109** (16): 6241-6246.
- Schröngge K., Barr B., Wardlaw J.C., Napper E., Gardner M.G. *et al.* (2002). When rare species become endangered: cryptic speciation in myrmecophilous hoverflies. *Biological Journal of the Linnean Society* **75**: 291-300.
- Schümann J., Hertweck C. (2006). Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. *Journal of Biotechnology* **124**: 690-703.
- Seymour F.A., Crittenden P.D., Dickinson M.J., Paoletti M., Montiel D. *et al.* (2005). Breeding systems in the lichen-forming fungal genus *Cladonia*. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 554-563.
- Singh G., Dal Grande F., Cornejo C., Schmitt I., Scheidegger C. (2012). Genetic Basis of Self-Incompatibility in the Lichen-Forming Fungus *Lobaria pulmonaria* and Skewed Frequency Distribution of Mating-Type Idiomorphs: Implications for Conservation. *PLoS ONE* **7** (12): e51402.
- Sites J.W., Marshall J.C. (2004). Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **35**: 199-227.
- Simpson G. G. (1951). The species concept. *Evolution* **5**: 285-298.
- Škaloud P., Peksa O. (2008). Comparative study of chloroplast morphology and ontogeny in *Asterochloris*. *Biologia* **63**: 869-876.
- Škaloud P., Peksa O. (2010). Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 36-46.
- Spribille T., Klug B., Mayrhofer H. (2011). A phylogenetic analysis of the boreal lichen *Mycoblastus sanguinarius* (Mycoblastaceae, lichenized Ascomycota) reveals cryptic clades correlated with fatty acid profiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **59** (3): 603-614.
- Stamatakis A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688-2690.
- Stiller J.W., Hall B.D. (1997). The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* (PNAS) **94**: 4250-4255.
- Strahler A.N., Strahler A.H. (2005). *Geografía física*. Ed. Omega. Barcelona.
- Suija A. (2006). Variation of morphological characters in the lichenicolous ascomycete genus *Abrothallus*. *Annales Botanici Fennici* **43**: 193-204.
- Sultan S. E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* **5** (12): 537-542.
- Swofford D.L. (2003). PAUP*. Phylogenetic Analysis using Parsimony (and other Methods), Version 4.0 b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tehler A., Irestedt M. (2007). Parallel evolution of lichen growth forms in the family Roccellaceae (Arthoniales, Ascomycota). *Cladistics* **23** (5): 432-454.
- Templeton A. R. (1989). The meaning of species and speciation: A genetic perspective. [In:] *Speciation and its consequences* (D. Otte & J. A. Endler, Eds.): 3-27. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Templeton A. R. (1998). Species and speciation: Geography, population structure, ecology, and gene trees. [In:] *Endless forms: Species and speciation* (D. J. Howard & S. H. Berlocher, Eds.): 32-43. Oxford University Press, New York.
- Timdal E., Holtan-Hartwig J. (1988). A preliminary key to *Rhizocarpon* in Scandinavia. *Graphis Scripta* **2**: 41-54.
- Thell A., Feuerer T., Kärnefelt I., Myllys L., Stenroos S. (2004). Monophyletic groups within the *Parmeliaceae* identified by ITS rDNA, β -tubulin and GAPDH sequences. *Mycological Progress* **3**: 297-314.
- Thell A., Högnabba F., Elix J.A., Feuerer T., Kärnefelt I. *et al.* (2009). Phylogeny of the cetrarioid core (Parmeliaceae) based on five genetic markers. *The Lichenologist* **41** (5): 489-511.
- Thomson J.W. (1967). Notes on *Rhizocarpon* in the arctic. *Nova Hedwigia* **14**: 421-481.
- Tornabene F. (1848). *Lichenographia Sicula*. Atti Accad. Gioen. Catania, V. Catania.
- Truong C. (2012). Systematics of the lichen genus *Usnea* in tropical South America. Tesis Doctoral. Universidad de Ginebra. Ginebra.
- Vaino EDV. A. (1883). Adjumenta ad Lichenographiam Lapponiae Fennicae at que Fenniae borealis, II. *Medd. Soc. Fauna et Flora Fenn.* **10**. Helsingfors.
- Vaino EDV. A. (1909). Lichenes in vicinias stationis hibernae expeditionis Vegae prope Pagum Pitlekai in Sibiria septentrionali. *Rhizocarpon* p. 110-116. *Arkiv för Botanik*, Vol. **VIII**, (4), Stockholm.

- Van Valen L. (1976). Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* **25**: 233-239.
- Vargas Castillo R., Beck A (2012). Photobiont selectivity and specificity in Caloplaca species in a fog-induced community in the Atacama Desert, northern Chile. *Fungal Biology* **116** (6): 665-676.
- Vieites D.R., Wollenberg K.C., Andreone F., Köhler J., Glaw F., Vences M. (2009) Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* (PNAS) **106**: 8267-8272.
- Vilgalys R., Hester M. (1990). Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several Cryptococcus Species. *Journal of bacteriology* **172**: 4238-4246.
- Vivas M. (2012). Adaptación y tolerancia de los líquenes a condiciones adversas a través de gradientes ambientales. Tesis Doctoral. Facultad de C.C. Biológicas. UCM. Madrid.
- Vondrák J., Etayo J. (2007). A contribution to the diversity of lichen-forming and lichenicolous fungi in the Spanish Pyrenees. *Herzogia* **20**: 189-198.
- Vondrák J., Říha P., Arup U., Søchting U. (2009). The taxonomy of the *Caloplaca citrina* group (*Teleschistaceae*) in the Black Sea region; with contributions to the cryptic species concept in lichenology. *The Lichenologist* **41** (6): 571-604.
- Vrijenhoek R.C. (2009). Cryptic species, phenotypic plasticity, and complex life histories: Assessing deepsea faunal diversity with molecular markers. *Deep-Sea Res Part II-Top Stud. Oceanogr.* **56**: 1713-1723.
- Vrijenhoek R.C., Schutz S.J., Gustafson R.G., Lutz R.A. (1994). Cryptic species of deep-sea clams (Mollusca, Bivalvia, Vesicomidae) from hydrothermal vent and cold-water seep environments. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **41** (8): 1171-1189.
- Wallroth F. G. (1831). *Flora Cryptogamica Germaniae, pars prior continens Filices, Lichenastra, Muscos et Lichenes.*
- Wedin M., Wiklund E., Crewe A., Döring H., Ekman S. *et al.* (2005). Phylogenetic relationships of *Lecanoromycetes* (Ascomycota) as revealed by analyses of mtSSU and nLSU rDNA sequence data. *Mycological Research* **109** (2): 159-172.
- Wedin M., Jørgensen P.M., Ekman E. (2011). *Vahliellaceae*, a new family of cyanobacterial lichens (*Peltigerales*, Ascomycetes). *The Lichenologist* **43** (1): 67-72.
- Werth S., Sork V.L. (2008). Local genetic structure in a north american epiphytic lichen, *Ramalina menziesii* (Ramalinaceae). *American Journal of Botany* **95** (5): 568-576.
- Werth S., Sork V.L. (2010). Identity and genetic structure of photobiont of the epiphytic lichen *Ramalina menziesii* on three oak species in Southern California. *American Journal of Botany* **97**: 821-830.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. [In:] *PCR Protocols* (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, J. White, Eds.): 315-322. Academic Press, San Diego.
- Wiley E. O. (1978). The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Biology* **27**: 17-26.
- Winschester V., Chaujar R.K. (2002). Lichenometric dating of slope movements, Nant Francon, North Wales. *Geomorphology* **47**: 61-74.
- Wirth V. (1972). Die Silikatflechten-Gemeinschaften im ausseralpinen Zentraleuropa. *Dissertationes Botanicae* **17**: 1-325.
- Wirth V. (1980). *Changes in the Lichen Flora and Lichen Vegetation of the Federal Republic of Germany.* Translated for the US Department of Agriculture and the National Science Foundation by the Al Ahram Center for Scientific Translations.
- Wirth V. (1995). *Die Flechten Baden-Württembergs.* Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Wirtz N., Printzen C., Lumbsch H.T. (2008). The delimitation of Antarctic and bipolar species of neuropogonoid *Usnea* (Ascomycota *Lecanorales*): a cohesion approach of species recognition for the *Usnea perpusilla* complex. *Mycological Research* **112**: 472-484.
- Wirtz N., Printzen C., Sancho L.G., Lumbsch H.T. (2006). The phylogeny and classification of *Neuropogon* and *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota) revisited. *Taxon* **55** (2): 367-376.
- Wirtz N., Lumbsch H.T., Green T.G.A., Türk R., Pintado A. *et al.* (2003). Lichen fungi have low cyanobiont selectivity in maritime Antarctica. *New Phytologist* **160**: 177-183.
- Wornik S., Grube M. (2010). Joint dispersal does not imply maintenance of partnerships in lichen symbioses. *Microbial Ecology* **59** (1): 150-157.
- Yahr R., Vilgalys R., DePriest P.T. (2006) Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (*Cladoniaceae*) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New Phytologist* **171**: 847-860.
- Yang Z., Rannala B. (2010). Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* (PNAS) **107**:9264-9269.
- Yun S.H., Berbee M.L., Yoder O.C., Turgeon B.G. (1999). Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* (PNAS) **96**, 5592-5597.
- Zahlbruckner A. (1926). *Catalogus Lichenum Universalis*, **IV**, pp: 20-25. Leipzig
- Zhu C., Yu S.Y. (2007). Lichenometric constraints on the age of the Huashan Grottoes, East China. *Journal of Archaeological Science* **34**: 2064-2070.
- Zoller S., Lutzoni F., Scheidegger C. (1999). Genetic variation within and among populations of the threatened lichen *Lobaria pulmonaria* in Switzerland and implications for its conservation. *Molecular Ecology* **8**: 2049-2059.

APÉNDICE 1 / APPENDIX 1

Secuencias depositadas en la base del GenBank, en proceso de conceder el número de acceso.

Sequences submitted in Genbank, we are waiting for access number.

APÉNDICE 2 / APPENDIX 2

A.- Tablas observaciones anatómicas macro-micro morfológicas y químicas.

Nº MAF	CT	Hip	FAr	Coll	DAr	NAP	FAP	A/C	I	Pd	KOH	Rhi	Pso	CEst	Est	Gir	Nors	Hip
16677	2	1	1	1	0,9	29	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
16717	0	1	0	0	0,7	41	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16662	1	1	0	0	0,6	27	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16719	0	0	0	0	0,6	53	0	0	1	1*	1	1	1	0	0	0	0	0
16663	1	1	0	0	0,5	55	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16638	2	1	1	0	0,5	26	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16639	2	1	1	1	0,9	15	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16722	2	1	1	0	0,7	56	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16721	2	1	1	0	0,7	14	1	0	1	1*	1	1	1	0	0	0	0	0
16718	1	1	0	0	0,6	33	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16668	1	0	1	1	0,9	56	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16726	0	0	0	0	0,6	37	2	1	1	1*	1	1	1	0	0	0	0	0
16733	2	0	0	1	0,6	45	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16732	1	1	0	1	0,5	91	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16715	1	1	0	2	0,8	57	1	0	1	1*	0	1	1	0	0	0	0	0
16683	1	1	1	2	1	30	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16687	1	0	0	1	0,8	53	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16689	1	1	1	2	0,9	42	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16685	1	1	0	1	0,6	51	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16688	1	0	0	2	1,2	30	1	1	1	1*	1	1	1	0	0	0	0	0
16709	1	1	0	0	0,7	16	1	0	1	1*	1	1	1	0	0	0	0	0
16642	2	1	0	2	1	46	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
16706	1	1	0	1	1	15	2	1	1	1*	1	1	1	0	0	0	0	0
16707	1	1	0	2	1,4	16	2	1	1	1*	1	1	1	0	0	0	0	0
16731	2	1	1	2	0,8	60	0	1	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0
16734	1	1	0	2	0,8	25	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16729	2	1	0	1	0,9	27	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16730	2	1	1	0	1	43	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16739	1	1	0	0	1	23	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16645	1	1	1	2	0,8	15	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16657	1	1	1	2	1,3	16	1	1	1	1*	1	1	1	0	0	0	0	0
16660	2	1	0	2	1,6	13	1	1	1	1*	1	1	1	0	0	0	0	0
16737	2	1	0	0	0,6	39	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
16659	1	1	0	2	0,9	19	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16661	2	0	1	1	1,3	32	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16669	1	1	0	2	1,1	9,3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0

Tabla A.1a.- Observaciones macro-morfológicas y químicas (test de manchado, TLC y reacción del epihimenio a la KOH) del Linaje I. Para los caracteres cuantitativos se dan las medias aritméticas de las medidas tomadas para cada uno de los caracteres estudiados. * Reacción positiva al Pd de color Naranja.

Nº MAF	CT	Hip	FAr	Coll	DAR	NAP	FAP	A/C	I	Pd	K	Rhi	Pso	CEst	Est	Gir	Nors	Hip
16647	1	1	1	2	0,5	21,7	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16640	0	1	1	0	0,9	9	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16664	0	1	1	1	0,8	31,7	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16658	0	0	0	1	0,8	23,3	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16654	2	1	1	0	0,6	37,7	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16650	1	1	0	0	0,7	82,7	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16635	1	1	1	0	0,7	46,3	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16697	1	1	0	0	0,6	28	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16696	2	1	0	0	0,4	114	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16691	1	1	1	1	0,9	37,7	0	1	1	1*	0	1	1	0	0	0	0	0
16667	1	1	1	0	0,7	10,7	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16636	1	1	1	0	0,7	49,7	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16651	1	0	1	2	1,8	35	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
16652	1	1	1	2	0,6	7,33	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16738	1	1	1	2	1,2	27,3	1	1	1	1*	0	1	1	0	0	0	0	0
16735	0	1	0	0	0,9	23,3	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16740	0	1	0	1	0,7	44,5	0	0	1	1*	0	1	1	0	0	0	0	0
16673	2	1	1	2	0,5	69	1	1	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0
16704	2	1	0	1	0,7	26,7	1	0	1	1*	0	1	1	0	0	1	0	0
16670	1	0	1	2	0,6	100	1	1	1	2	0	1	0	0	1	0	0	1
16705	2	1	1	2	0,5	100	0	1	1	2	0	1	0	1	1	0	0	0
16741	1	1	1	2	0,4	89	1	0	1	2	0	1	0	0	1	0	0	1
16708	1	1	0	1	0,6	58	1	1	1	1*	0	1	1	0	0	0	0	0
16700	2	1	1	0	0,7	42	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16643	2	1	1	1	0,7	24,7	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
16653	2	1	1	1	0,5	63,3	2	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0
16710	1	1	1	1	1,1	21	1	1	1	2	0	1	0	1	1	0	0	0
16703	0	1	0	0	0,8	57	1	1	1	2	0	1	0	1	1	0	0	0
16711	0	1	0	0	0,6	37	1	0	1	2	0	1	0	1	1	0	0	0

Tabla A.1.b.- Observaciones macro-morfológicas y químicas (test de manchado, TLC y reacción epihimenio a KOH) del Linaje II. Para los caracteres cuantitativos se dan las medias aritméticas de las medidas tomadas para cada uno de los caracteres estudiados. * Reacción positiva al Pd de color Naranja.

Nº MAF	CT	Hip	FAr	Coll	DAr	NAp	FAp	A/C	I	Pd	K	Rhi	Pso	CEst	Est	Gir	Nors	Hip
16666	2	1	1	1	0,5	32,5	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16712	2	1	0	0	0,6	28,7	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16656	2	1	1	0	0,5	18,5	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16671	2	1	0	1	0,7	18	1	1	1	1*	0	1	1	0	0	0	0	0
16644	2	1	0	0	0,6	22,3	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16699	2	1	0	1	0,7	17,3	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16725	1	1	0	0	0,9	36,3	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16695	2	1	1	0	0,6	68,7	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
16665	1	1	0	2	0,9	18,7	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
16690	2	1	1	1	0,5	20	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
16641	1	1	1	0	0,7	24,7	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16646	2	1	1	0	0,5	30,7	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16672	1	0	0	2	1,5	56	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16713	1	1	0	0	0,6	30,5	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16645	0	1	1	1	0,9	35,7	1	1	1	1*	0	1	1	0	0	1	0	0
16724	0	1	1	0	0,8	22,3	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16692	2	1	1	0	0,9	8	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
16693-2	2	1	0	1	0,7	25,3	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
16693	2	1	0	1	0,7	28	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
16698	2	0	1	0	0,7	42,3	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
16649	2	1	1	0	0,9	25	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
16681	2	1	1	1	0,7	30	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
16686	1	0	1	1	0,6	37,5	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
16720	1	1	0	1	0,8	37,7	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0
16727	1	0	0	1	0,7	57	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
16714	0	1	1	1	1,3	27	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16881	0	1	1	1	1,3	31,7	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
16716	1	1	0	0	0,6	47,3	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
16728	0	1	1	1	1,1	20	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16723	1	1	1	0	0,9	76	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16694	1	1	0	0	0,6	61	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16678	1	0	1	0	0,8	31	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
16679	0	0	0	0	1,3	29	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16684	1	1	1	1	1,4	26,7	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
16680	2	1	1	1	1,4	27,7	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0

Tabla A.1.b.- Continuación Linaje II. Para los caracteres cuantitativos se dan las medias aritméticas de las medidas tomadas para cada uno de los caracteres estudiados. * Reacción positiva al Pd de color Naranja.

N° MAF	AAr	DAp	AAp	AHim	CHim	AnEx	CEx	CSp	LgSp	AnSp
16677	710,9	860,1	387,4	171,7	0	47,8	0	7,3	26,7	12,7
16717	417,3	788,6	482,6	242,8	0	57,1	0	11	30,6	15,1
16662	525,7	708,9	395,1	210,3	0	91,9	0	9,8	32,4	14,7
16719	377,5	825,5	398,5	159,1	0	58,4	1	9,5	28,8	12,9
16663	316,8	870,7	418,3	155,7	0	53,8	0	9,2	28,5	12,6
16638	377,9	382,7	233,8	160	0	48,3	0	11	30	15,6
16639	794,8	541	585,4	383,5	0	92,9	0	14	37,1	17,4
16722	441,1	1004	400,8	211,2	0	66,2	0	15	35,1	15,8
16721	319,7	751,7	311,8	202,5	0	59,3	0	8,2	27	12,2
16718	431,9	630,3	369,5	199,7	0	64,1	0	8,3	30,5	14,5
16668	590,5	577,2	255,7	162,3	0	74,5	0	9,7	37,6	15,7
16726	342,9	687,6	462,7	271,8	0	46,1	0	10	28,8	13,7
16733	298,6	623,2	325,2	180,9	0	76,1	1	12	26,1	12,8
16732	424,5	790,3	450,9	160,6	0	67,6	0	10	26,5	12,8
16715	451,6	734,1	374,9	235,1	0	89,1	0	25	45,6	21,1
16683	724,2	971,7	461,1	260,8	0	92,9	0	9,2	32,5	17,1
16687	781,9	803,5	598,2	380,9	0	92,1	1	17	39	19,2
16689	416	765,9	394,7	295,9	0	80,4	1	19	32,8	20,1
16685	504,4	673,5	330,1	213,8	0	55,4	1	13	31,7	17,8
16688	436,8	954,9	385,7	287,8	0	65,4	1	24	41,1	18,9
16709	265,2	401,8	318,8	209,7	0	45	0	21	38,8	20,9
16642	802,8	805	400,9	268,2	0	85,2	0	9,8	33,2	16,4
16706	597,3	1038	653,5	363,1	0	110	1	17	40,8	19,4
16707	562,5	919,6	540,7	354,9	0	70,2	0	21	46,7	18,7
16731	379,4	657,1	380,7	204,2	0	56,6	0	25	38,4	13,6
16734	422,2	1093	529,5	279,2	0	99	0	21	42,3	18,4
16729	395,8	865,7	429,4	242,7	0	88,9	0	19	42,6	16,8
16730	576,3	982,3	462,4	274	0	97,9	0	16	35,2	18
16739	400,7	914,7	405,3	256,7	0	50,4	0	16	33,3	17,2
16645	737,1	1302	510,8	311,6	0	82,7	0	13	29,7	17,4
16657	636,9	788,5	459,1	309,5	0	96,2	1	15	34,2	17,1
16660	796,4	951,3	544,1	370,1	0	59,7	0	17	42	18,9
16737	464,2	759,9	369,8	231,9	0	108	1	27	39,4	20,2
16659	396,2	757,5	393,3	275,3	0	40,1	0	8,3	34,3	17
16661	519,6	918,8	525,4	395,1	0	63,6	0	19	41,9	16,3
16669	530,4	835,7	473,6	304,7	0	82	0	18	40,8	17,6

Tabla A.2.a.- Observaciones Micro-morfológicas del Linaje I. Para los caracteres cuantitativos se dan las medias aritméticas de las medidas tomadas para cada uno de los caracteres estudiados.

N° MAF	AAr	DAP	AAp	AHim	CHim	AnEx	CEx	CSp	LgSp	AnSp
16647	379,4	543,4	312,4	173,1	0	52,3	0	11,7	32	14,8
16640	738,6	799,1	485,1	254,2	0	50,3	0	8	31,8	15,3
16664	620,6	1094	413,7	299,1	0	55,6	0	13	32,6	13,7
16658	563,7	601,8	363,5	217,7	0	52,4	0	17,5	36,5	16,7
16654	374,3	847,3	352,3	202,1	0	59,5	0	17,5	33,4	15,8
16650	345	566	365,3	174,6	0	102	0	14,5	42,5	20,7
16635	520,9	662,2	454,8	192,1	1	94,3	0	16,8	51,3	13,2
16697	582,6	749,2	401,9	218,9	0	134	0	13	36,2	16,5
16696	435,1	413,2	336	186	0	72,2	0	12,6	32,7	14,7
16691	509,1	831,9	597,3	297,1	0	44,6	0	14,6	41,8	15,2
16667	615,3	692,5	454,3	216,2	0	65	0	16,2	32,7	16,8
16636	487,6	595	359	164,9	0	76,4	0	17,8	35,4	17,5
16651	371,5	665,2	294,2	184	1	88,6	0	24,3	39,2	16,8
16652	245,3	310,8	239,3	172,3	0	40,4	0	24	39,7	16,2
16738	455	656,3	409,3	269,3	0	65,2	0	28,7	39,2	16,9
16735	387,4	722	349,4	256	1	103	0	27,7	40,6	18,3
16740	338,7	708	365,8	254	0	71,4	0	30,3	48,4	17,4
16673	351,8	647,7	333,6	214,1	0	45,2	0	21,8	42,4	16,9
16704	525,1	1118	488,1	242,2	1	90,7	0	25	44,4	16,3
16670	454,9	743	322,6	216,1	0	96,5	1	28	41,1	17,6
16705	433	784,2	430,4	249,8	1	96,2	1	34,3	46,3	18,8
16741	288,6	533,7	309,6	203,1	0	82,3	0	34,3	41,9	18,2
16708	395,6	535,5	420	197,4	0	75	0	30,2	43,3	18,8
16700	679,2	872,2	409	229,6	0	126	0	20,5	39,5	21
16643	770,3	836,9	497,2	275,5	1	58,7	0	19,8	45,5	15,5
16653	241,7	692,8	421,1	283,2	0	99,7	0	28,2	43,1	18,9
16710	735,6	990,1	435,7	232,4	0	80,4	0	23,7	37,9	18,3
16703	429,9	705,5	408,2	262,9	0	104	0	27,5	43	19,5
16711	435,7	677,2	377	260,9	0	100	0	12	44,3	18,7

Tabla A.2.b.- Observaciones Micro-morfológicas del Linaje II. Para los caracteres cuantitativos se dan las medias aritméticas de las medidas tomadas para cada uno de los caracteres estudiados.

Nº MAF	AAr	DAp	AAp	AHim	CHim	AnEx	CEx	CSp	LgSp	AnSp
16666	485,4	847,1	503,4	204,9	0	103	0	10,3	31	16,4
16712	401,7	851,4	468,1	311,1	0	80,6	0	12,7	38,6	15,5
16656	528,1	679,4	453,8	249,4	0	83,4	0	16,3	33,6	15,9
16671	537,7	577,1	368,7	219,8	0	70,7	0	14	36,3	16
16644	455,8	387,3	370,1	216,5	1	52,9	0	10,3	38,3	15,2
16699	501,2	756	408,2	227,4	0	59,2	0	20,8	43,5	18,4
16725	458,3	787	437,3	175,3	0	49,6	0	19,8	41,9	17,6
16695	450,5	672,5	375,4	223,6	0	102	0	10	35,6	17,1
16665	537,3	714,5	476	223,4	0	79,4	1	12,5	30,5	17,8
16690	415,8	543,4	441,4	299,1	0	71,5	0	13,3	36	18,6
16641	645,1	680,6	392,1	201,3	0	77,7	0	8,6	36,4	15,7
16646	381,7	410,4	305,8	195,9	0	89,5	0	8	26,3	14,8
16672	500,1	878,8	380,7	225,6	0	101	0	14,8	35	17,4
16713	372,7	425,3	317,2	174,8	0	40,6	0	12,7	41,5	17,9
16645	478,6	855,7	375,2	159	0	55	0	9,5	34,8	14,8
16724	614,3	814,1	412	186,3	0	74,5	0	16,7	31,7	17,7
16692	854,7	792,8	551,4	220,1	0	67	0	9,5	34,7	16
16693-2	863,7	388,4	335	160,8	0	49	0	8	30,9	16,3
16693	528	526,3	329,1	184,3	0	64,9	0	10,4	36,7	17,9
16698	548,8	809,8	388,3	180,9	0	61,2	0	16,4	39,5	18,1
16649	591,6	690,4	382,1	158,9	0	85,3	0	9,6	30,2	18,6
16681	642,5	875,4	576,9	328,3	0	77,9	1	14,7	34,4	16,6
16686	412,4	615,8	517,2	331	1	84,3	0	15,3	37	15,3
16720	495,6	833,4	448,5	233,2	0	107	1	23,2	43,7	17,7
16727	324,2	586,2	453	217,9	1	84,7	1	23,7	39	19,5
16714	607,5	1014	592,5	301,6	0	51,8	0	31,7	48,7	19,9
16881	758,1	1122	479,6	264,6	0	93	0	27	47,6	22
16716	428,1	765,4	425,3	232,7	1	53	1	28,5	46,4	20,4
16728	483,8	740,7	419,4	259,8	1	71,5	1	25	47	21,2
16723	355,5	639,9	318	160,1	0	74,7	0	30,8	43,6	22
16694	474,6	737,8	467	291,7	1	81,6	0	14,4	39,1	18,2
16678	550,1	766,5	419,6	296,1	0	64,7	0	17,5	43,7	21,6
16679	697,3	849,8	658,5	460,5	0	97,7	0	23,3	40,8	22
16684	662,4	837,2	548,8	296,4	0	94,9	0	17,5	40,7	17,2
16680	654,8	842,5	660,1	445,3	0	106	0	22	44,1	19,7

Tabla A.2.b.- Continuación Linaje II. Para los caracteres cuantitativos se dan las medias aritméticas de las medidas tomadas para cada uno de los caracteres estudiados.

B.- Valores para los parámetros de probabilidad obtenidos en el análisis bayesiano (MC³).

B.1.- Resumen valores análisis bayesiano para la Figura 2.2.

LnL= -8083.623 (± 0.32)

TL= 19.33 (±0.05)

-Frecuencia de bases para la región ITS nu:

$\pi(A) = 0.206 (\pm 0.0001)$ $\pi(C) = 0.328 (\pm 0.0001)$ $\pi(G) = 0.254 (\pm 0.0001)$

$\pi(T) = 0.210 (\pm 0.0001)$

$r(AC) = 0.0704 (\pm 0.00006)$

$r(CG) = 0.0519 (\pm 0.00005)$

$r(AG) = 0.289 (\pm 0.0002)$

$r(CT) = 0.460 (\pm 0.0002)$

$r(AT) = 0.0690 (\pm 0.00008)$

$r(GT) = 0.0587 (\pm 0.00007)$

Gamma determinada por el parámetro alfa= 0.519 (± 0.001)

p-invar = 0.152 (±0.0007).

-Frecuencia de bases para la región LSU mt:

$\pi(A) = 0.357 (\pm 0.0003)$ $\pi(C) = 0.126 (\pm 0.0005)$ $\pi(G) = 0.178 (\pm 0.0002)$

$\pi(T) = 0.338 (\pm 0.0004)$

$r(AC) = 0.0281 (\pm 0.00008)$

$r(CG) = 0.194 (\pm 0.001)$

$r(AG) = 0.178 (\pm 0.0008)$

$r(CT) = 0.339 (\pm 0.001)$

$r(AT) = 0.145 (\pm 0.0006)$

$r(GT) = 0.114 (\pm 0.0006)$

Gamma determinada por el parámetro alfa= 0.153 (± 0.0001).

pinvar = 0.53 (±0.0004).

B.2.- Resumen valores análisis bayesiano para las Figura 2.3.

LnL= -4849.868 (± 0.46)

TL= 3.51 (±0.02)

-Frecuencia de bases para la región ITS nu:

$r(AC) = 0.088 (0.0001)$ $r(CG) = 0.074 (\pm 0.0001)$

$r(AG) = 0.189 (\pm 0.0004)$ $r(CT) = 0.053 (\pm 0.0007)$

$r(AT) = 0.054 (\pm 0.0002)$ $r(GT) = 0.054 (\pm 0.0001)$

Gamma determinada por el parámetro alfa= 0.763 (± 0.003)

p-invar = 0.261 (±0.0012).

B.3.- Resumen valores análisis bayesiano para las Figuras 2.4, 2.5 y 2.8.

LnL= -7779.754 (± 0.25)

TL= 18.67 (± 0.05)

-Frecuencia de bases para la región ITS nu:

$\pi(A) = 0.209 (\pm 0.0001)$ $\pi(C) = 0.328 (\pm 0.0001)$ $\pi(G) = 0.252 (\pm 0.0001)$

$\pi(T) = 0.210 (\pm 0.00009)$

$r(AC) = 0.0700 (\pm 0.00006)$

$r(CG) = 0.0534 (\pm 0.00005)$

$r(AG) = 0.289 (\pm 0.0002)$

$r(CT) = 0.460 (\pm 0.0002)$

$r(AT) = 0.0667 (\pm 0.0007)$

$r(GT) = 0.0601 (\pm 0.00007)$

Gamma determinada por el parámetro alfa= 0.569 (\pm 0.01).

pinvar = 0.212(\pm 0.0006).

-Frecuencia de bases para la región LSU mit:

$\pi(A) = 0.355 (\pm 0.0003)$

$\pi(C) = 0.128 (\pm 0.0006)$

$\pi(G) = 0.178 (\pm 0.0001)$

$\pi(T) = 0.338 (\pm 0.0003)$

$r(AC) = 0.0285 (\pm 0.00009)$

$r(CG) = 0.177 (\pm 0.001)$

$r(AG) = 0.191 (\pm 0.001)$

$r(CT) = 0.327 (\pm 0.001)$

$r(AT) = 0.157 (\pm 0.0007)$

$r(GT) = 0.117 (\pm 0.0007)$

Gamma determinada por el parámetro alfa= 0.154 (\pm 0.00013).

pinvar = 0.529 (\pm 0.0004).

C.- Resumen resultados del Análisis de Clasificación por *Cluster*.

C.1.- Resumen *Clusters* generados comparados con el Linaje I (1 en las columnas) y el Linaje II (2 en las columnas).

The FREQ Procedure
Table of Grupo by clus2

Grupo (Grupo)	clus2 (clus2)		
	1	2	Total
1	19 52.78 38.78	17 47.22 33.33	36
2	30 46.88 61.22	34 53.13 66.67	64
Total	49	51	100

Statistics for Table of Grupo by clus2

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	0.3212	0.5709
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.3213	0.5708
Continuity Adj. Chi-Square	1	0.1285	0.7200
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.3180	0.5728
Phi Coefficient		0.0567	
Contingency Coefficient		0.0566	
Cramer's V		0.0567	

Sample Size = 100

Table of Grupo by clus3
Grupo (Grupo) clus3 (clus3)

Frequency Row Pct Col Pct	1	2	3	Total
1	18 50.00 39.13	6 16.67 19.35	12 33.33 52.17	36
2	28 43.75 60.87	25 39.06 80.65	11 17.19 47.83	64
Total	46	31	23	100

Statistics for Table of Grupo by clus3

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	2	6.5349	0.0381
Likelihood Ratio Chi-Square	2	6.8019	0.0333
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.3506	0.5538
Phi Coefficient		0.2556	
Contingency Coefficient		0.2477	
Cramer's V		0.2556	

Sample Size = 100

Table of Grupo by clus4
Grupo (Grupo) clus4 (clus4)

Frequency Row Pct Col Pct	1	2	3	4	Total
1	15 41.67 51.72	7 19.44 25.00	6 16.67 20.00	8 22.22 61.54	36
2	14 21.88 48.28	21 32.81 75.00	24 37.50 80.00	5 7.81 38.46	64
Total	29	28	30	13	100

Statistics for Table of Grupo by clus4

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	3	11.5959	0.0089
Likelihood Ratio Chi-Square	3	11.6774	0.0086
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.3065	0.5798
Phi Coefficient		0.3405	
Contingency Coefficient		0.3224	
Cramer's V		0.3405	

Sample Size = 100

Table of Grupo by clus5
clus5(clus5)

Grupo (Grupo)	clus5(clus5)					Total
Frequency Row Pct Col Pct	1	2	3	4	5	
1	14 38.89 51.85	8 22.22 27.59	6 16.67 31.58	1 2.78 7.69	7 19.44 58.33	36
2	13 20.31 48.15	21 32.81 72.41	13 20.31 68.42	12 18.75 92.31	5 7.81 41.67	64
Total	27	29	19	13	12	100

Statistics for Table of Grupo by clus5

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	4	11.1161	0.0253
Likelihood Ratio Chi-Square	4	12.0781	0.0168
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.4790	0.4889
Phi Coefficient		0.3334	
Contingency Coefficient		0.3163	
Cramer's V		0.3334	

Sample Size = 100

Table of Grupo by clus7
clus7(clus7)

Grupo (Grupo)	clus7(clus7)							Total
Frequency Row Pct Col Pct	1	2	3	4	5	6	7	
1	12 33.33 80.00	4 11.11 28.57	1 2.78 5.88	4 11.11 40.00	7 19.44 36.84	1 2.78 7.69	7 19.44 58.33	36
2	3 4.69 20.00	10 15.63 71.43	16 25.00 94.12	6 9.38 60.00	12 18.75 63.16	12 18.75 92.31	5 7.81 41.67	64
Total	15	14	17	10	19	13	12	100

Statistics for Table of Grupo by clus7

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	6	26.8268	0.0002
Likelihood Ratio Chi-Square	6	29.4936	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	1.5387	0.2148
Phi Coefficient		0.5179	
Contingency Coefficient		0.4599	
Cramer's V		0.5179	

Sample Size = 100

WARNING: 21% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

C.2.- Variables Activas (Ilustrativas) en Clasificación por *Cluster* para la agrupación en 4 clases.

En sombreado se indican las variables con medias inferiores a la media general.

Clase 1 / 4 (Tamaño = 29 Individuos)

Variables significativas dentro de la clase	Media de la Clase	Media General	SD de la Clase	SD General	Test-valor	p-valor
AAr	447,186	505,774	124,472	143,545	-2,60	0,005
DAr	0,651	0,806	0,124	0,269	-3,68	0,000
DAP	625,492	748,456	164,625	179,150	-4,36	0,000
AnEx	61,177	75,558	15,208	20,457	-4,47	0,000
AAp	356,363	422,809	58,033	87,854	-4,81	0,000
AHim	193,843	243,132	32,072	64,102	-4,89	0,000
CSp	11,603	17,193	4,250	6,998	-5,08	0,000
LgSp	32,555	37,553	4,299	5,827	-5,45	0,000
AnSp	15,101	17,167	1,664	2,276	-5,77	0,000

Clase 2 / 4 (Tamaño = 28 Individuos)

Variables significativas dentro de la clase	Media de la Clase	Media General	SD de la Clase	SD General	Valor del Test	p-valor
AAr	592,646	505,774	124,562	143,545	3,76	0,000
DAP	845,470	748,456	160,013	179,150	3,36	0,000
AAp	457,743	422,809	57,483	87,854	2,47	0,007
LgSp	35,158	37,553	3,917	5,827	-2,55	0,005
CSp	14,198	17,193	4,022	6,998	-2,66	0,004
NAP	27,941	37,227	12,398	21,321	-2,70	0,003

Clase 3 / 4 (Tamaño = 30 Individuos)

Variables significativas dentro de la clase	Media de la Clase	Media General	SD de la Clase	SD General	Valor del Test	p-valor
CSp	23,962	17,193	5,706	6,998	6,30	0,000
LgSp	42,483	37,553	3,470	5,827	5,51	0,000
AnSp	18,863	17,167	1,862	2,276	4,85	0,000
NAP	48,972	37,227	22,959	21,321	3,59	0,000
AAp	391,326	422,809	47,072	87,854	-2,33	0,010
AAr	420,989	505,774	87,408	143,545	-3,85	0,000

Clase 4 / 4 (Tamaño = 13)

Variables significativas dentro de la clase	Media de la Clase	Media General	SD de la Clase	SD General	Valor del Test	p-valor
AHim	353,834	243,132	59,082	64,102	6,64	0,000
AAp	568,450	422,809	60,430	87,854	6,38	0,000
DAr	1,187	0,806	0,241	0,269	5,44	0,000
AAr	645,018	505,774	114,015	143,545	3,73	0,000
DAP	905,128	748,456	145,130	179,150	3,36	0,000
LgSp	42,483	37,553	3,269	5,827	3,25	0,001
AnSp	18,976	17,167	1,642	2,276	3,06	0,001

C.3.- Correspondencia individuos estudiados con la clase a la que pertenecen del Cluster 4.

LINAJE I	
Nº MAF	CLUSTER 4: CLASE
16677	1
16717	1
16662	1
16719	1
16663	1
16638	1
16639	4
16722	2
16721	1
16718	1
16668	1
16726	1
16733	1
16732	1
16715	3
16683	2
16687	4
16689	3
16685	1
16688	3
16709	3
16642	2
16706	4
16707	4
16731	1
16734	4
16729	3
16730	2
16739	2
16655	2
16657	2
16660	4
16737	3
16659	1
16661	4
16669	4

LINAJE II	
Nº MAF	CLUSTER 4: CLASE
16647	1
16640	2
16664	2
16658	1
16654	1
16650	3
16635	3
16697	2
16696	1
16691	2
16667	2
16636	1
16651	3
16652	1
16738	3
16735	3
16740	3
16673	3
16704	2
16670	3
16705	3
16741	3
16708	3
16700	3
16643	2
16653	3
16710	2
16703	3
16711	3

LINAJE II	
Nº MAF	CLUSTER 4: CLASE
16666	2
16712	2
16656	2
16671	1
16644	1
16699	3
16725	3
16695	1
16665	2
16690	2
16641	2
16646	1
16672	2
16713	1
16645	1
16724	2
16692	2
16693-2	1
16693	1
16698	2
16649	2
16714	4
16681	2
16686	2
16720	3
16727	3
16881	4
16716	3
16728	3
16723	3
16694	3
16678	3
16679	4
16684	4
16680	4

D.- Resumen de resultados del Análisis Discriminante.

SELECCION DE VARIABLES

1

Procedimiento STEPDISC

El método para las variables de selección es STEPWISE

TamañoMuestralTot	100	Variable(s) en el análisis	10
Niveles de clase	2	Las variables se incluirán	0
		Nivel de significación para	0.1
		Nivel de significación para	0.1

Número de observaciones leídas	100
Número de observaciones usadas	100

Información del nivel de clase

Grupo	Nombre de variable	Frecuencia	Peso	Proporción
1	_1	36	36.0000	0.360000
2	_2	64	64.0000	0.640000

Resumen de la selección Stepwise

Paso	Número en	Introducido	Eliminado	Etiqueta	R-cuadrado parcial	F-Valor	Pr > F	Wilks' Lambda	Pr < Lambda
1	1	LgSp		LgSp	0.1031	11.27	0.0011	0.89686964	0.0011
2	2	DAp		DAp	0.0826	8.74	0.0039	0.82276222	<.0001
3	3	AHim		AHim	0.0332	3.30	0.0726	0.79545918	<.0001
4	4	AAp		AAp	0.0571	5.76	0.0184	0.75000982	<.0001

Paso	Número en	Introducido	Eliminado	Correlación canónica cuadrada de la media	Pr > ASCC
1	1	LgSp		0.10313036	0.0011
2	2	DAp		0.17723778	<.0001
3	3	AHim		0.20454082	<.0001
4	4	AAp		0.24999018	<.0001

AJUSTE DEL MODELO 1

Procedimiento DISCRIM

Tamaño Muestra Total	100	Total DF	99
Variables	4	Clases Within DF	98
Clases	2	Clases Between DF	1

Número de observaciones leídas	100
Número de observaciones usadas	100

Información del nivel de clase

Grupo	Nombre de variable	Frecuencia	Peso	Proporción	Probabilidad a priori
1	_1	36	36.0000	0.360000	0.500000
2	_2	64	64.0000	0.640000	0.500000

Información de la matriz de covarianza ponderada

Rango de la matriz de covarianza	4	Registro natural de la Determinante de la matriz de covarianza	29.52884
----------------------------------	---	--	----------

Procedimiento DISCRIM

Distancias cuadradas generalizadas dos a dos entre grupos

$$D^2(i|j) = (\bar{X}_i - \bar{X}_j)' \text{COV}^{-1} (\bar{X}_i - \bar{X}_j)$$

Distancia cuadrada generalizada para Grupo

De Grupo	1	2
1	0	1.41775
2	1.41775	0

Función discriminante lineal

$$\text{Constante} = -.5 \sum_j \bar{X}_j^T \text{COV}_j^{-1} \bar{X}_j \quad \text{Vector de coeficiente} = \text{COV}_j^{-1} \bar{X}_j$$

Función discriminante lineal para Grupo

Variable	Etiqueta	1	2
Constante		-27.54287	-31.49333
LgSp	LgSp	1.02164	1.21527
DAP	DAP	0.01146	0.00678
AHim	AHim	-0.03190	-0.05044
AAp	AAp	0.04250	0.05406

Procedimiento DISCRIM

Resumen de clasificación para los datos calibrados: WORK.CLADOS
Resumen de resustitución usando Función discriminante lineal

Función de la distancia cuadrada generalizada

$$D_j^2(X) = (\bar{X}_j - X)' \text{COV}_j^{-1} (\bar{X}_j - X)$$

Probabilidad posterior de miembro en cada Grupo

$$\text{Pr}(j|X) = \exp(-.5 D_j^2(X)) / \sum_k \exp(-.5 D_k^2(X))$$

Número de observaciones y porcentaje clasificado en Grupo

De Grupo	1	2	Total
1	27 75.00	9 25.00	36 100.00
2	13 20.31	51 79.69	64 100.00
Total	40 40.00	60 60.00	100 100.00
Anteriores	0.5	0.5	

Estimaciones de cuenta de error para Grupo

	1	2	Total
Tasa	0.2500	0.2031	0.2266
Anteriores	0.5000	0.5000	

Procedimiento DISCRIM

Resultados de clasificación para los datos calibrados: WORK.CLADOS
Resultados de validación cruzada usando Función discriminante lineal

Función de la distancia cuadrada generalizada

$$D_j^2(X) = (\bar{X}_j - X)' \text{COV}_j^{-1} (\bar{X}_j - X)$$

Probabilidad posterior de miembro en cada Grupo

$$\text{Pr}(j|X) = \exp(-.5 D_j^2(X)) / \sum_k \exp(-.5 D_k^2(X))$$

Probabilidad posterior de pertenencia a Grupo

Obs (N° MAF)	Clasificado (* Observación mal clasificada)			
	De Grupo	en Grupo	1	2
16732	1	2 *	0.4950	0.5050
16668	1	2 *	0.3124	0.6876
16731	1	2 *	0.2481	0.7519
16715	1	2 *	0.1595	0.8405
16709	1	2 *	0.1422	0.8578
16737	1	2 *	0.4616	0.5384
16729	1	2 *	0.3092	0.6908
16706	1	2 *	0.4569	0.5431
16734	1	2 *	0.4372	0.5628
16707	1	2 *	0.3401	0.6599
16638	1	2 *	0.4871	0.5129
16639	1	2 *	0.2782	0.7218
16735	2	1 *	0.5619	0.4381
16654	2	1 *	0.7760	0.2240
16664	2	1 *	0.9882	0.0118
16640	2	1 *	0.6728	0.3272
16710	2	1 *	0.6473	0.3527
16680	2	1 *	0.5697	0.4303
16679	2	1 *	0.8144	0.1856
16681	2	1 *	0.7227	0.2773
16646	2	1 *	0.7603	0.2397
16695	2	1 *	0.5083	0.4917
16690	2	1 *	0.5174	0.4826
16665	2	1 *	0.5320	0.4680
16724	2	1 *	0.5961	0.4039
16662	2	1 *	0.7625	0.2375
16666	2	1 *	0.5061	0.4939
16712	2	1 *	0.7074	0.2926
16656	2	1 *	0.5085	0.4915

Procedimiento DISCRIM

Resumen de clasificación para los datos calibrados: WORK.CLADOS
Resumen de validación cruzada usando Función discriminante lineal

Función de la distancia cuadrada generalizada

$$D_j^2(X) = (X - \bar{X}_j)' \text{COV}^{-1}(X) (X - \bar{X}_j)$$

Probabilidad posterior de miembro en cada Grupo

$$\text{Pr}(j|X) = \exp(-.5 D_j^2(X)) / \sum_k \exp(-.5 D_k^2(X))$$

Número de observaciones y porcentaje clasificado en Grupo

De Grupo	1	2	Total
1	24 66.67	12 33.33	36 100.00
2	17 26.56	47 73.44	64 100.00
Total	41 41.00	59 59.00	100 100.00
Anteriores	0.5	0.5	

Estimaciones de cuenta de error para Grupo

	1	2	Total
Tasa	0.3333	0.2656	0.2995
Anteriores	0.5000	0.5000	

AJUSTE DEL MODELO 2

Procedimiento DISCRIM

TamañoMuestralTota	100	Total DF	99
Variables	10	Clases Within DF	98
Clases	2	Clases Between DF	1

Número de observaciones leídas 100
 Número de observaciones usadas 100

Información del nivel de clase

Grupo	Nombre de variable	Frecuencia	Peso	Proporción	Probabilidad a priori
1	_1	36	36.0000	0.360000	0.500000
2	_2	64	64.0000	0.640000	0.500000

Información de la matriz de covarianza ponderada

Rango de la matriz de covarianza	10	Registro natural de la Determinante de la matriz de covarianza	51.57554
----------------------------------	----	--	----------

Procedimiento DISCRIM

Distancias cuadradas generalizadas dos a dos entre grupos

$$D^2(i|j) = (\bar{X}_i - \bar{X}_j)' \text{COV}^{-1} (\bar{X}_i - \bar{X}_j)$$

Distancia cuadrada generalizada para Grupo

De Grupo	1	2
1	0	1.79148
2	1.79148	0

Función discriminante lineal

$$\text{Constante} = -.5 \sum_j \bar{X}_j' \text{COV}^{-1} \bar{X}_j \quad \text{Vector de coeficiente} = \text{COV}^{-1} \bar{X}_j$$

Función discriminante lineal para Grupo

Variable	Etiqueta	1	2
Constante		-54.89388	-59.24790
AAre	AAre	0.00355	0.00739
DAp	DAp	0.01695	0.01154
AAp	AAp	0.03489	0.04505
AHim	AHim	-0.03868	-0.05930
AnEx	AnEx	-0.02598	-0.00986
LgSp	LgSp	1.27059	1.42972
AnSp	AnSp	3.53451	3.56044
CSp	CSp	-1.21867	-1.14833
DAre	DAre	-0.05384	-1.29957
NAP	NAP	0.18104	0.16991

Procedimiento DISCRIM

Resumen de clasificación para los datos calibrados: WORK.CLADOS
 Resumen de resustitución usando Función discriminante lineal

Función de la distancia cuadrada generalizada

$$D^2(X) = (X - \bar{X}_j)' \text{COV}^{-1} (X - \bar{X}_j)$$

Probabilidad posterior de miembro en cada Grupo

$$\text{Pr}(j|X) = \exp(-.5 D^2(X)) / \sum_k \exp(-.5 D^2(X))$$

Número de observaciones y porcentaje clasificado en Grupo

De Grupo	1	2	Total
1	26 72.22	10 27.78	36 100.00
2	14 21.88	50 78.13	64 100.00
Total	40 40.00	60 60.00	100 100.00
Anteriores	0.5	0.5	

Estimaciones de cuenta de error para Grupo

	1	2	Total
Tasa	0.2778	0.2188	0.2483
Anteriores	0.5000	0.5000	

Procedimiento DISCRIM

Resultados de clasificación para los datos calibrados: WORK.CLADOS
Resultados de validación cruzada usando Función discriminante lineal

Función de la distancia cuadrada generalizada

$$D_j^2(X) = (X - \bar{X}_j)' \text{COV}^{-1}(X) (X - \bar{X}_j)$$

Probabilidad posterior de miembro en cada Grupo

$$\text{Pr}(j|X) = \exp(-.5 D_j^2(X)) / \sum_k \exp(-.5 D_k^2(X))$$

Probabilidad posterior de pertenencia a Grupo

Obs (N° MAF)	Clasificado (* Observación mal clasificada)			
	De Grupo	en Grupo	1	2
16668	1	2 *	0.2087	0.7913
16731	1	2 *	0.2310	0.7690
16715	1	2 *	0.0987	0.9013
16687	1	2 *	0.2862	0.7138
16709	1	2 *	0.0927	0.9073
16737	1	2 *	0.1021	0.8979
16729	1	2 *	0.3390	0.6610
16706	1	2 *	0.3646	0.6354
16734	1	2 *	0.4075	0.5925
16662	1	2 *	0.3892	0.6108
16638	1	2 *	0.4454	0.5546
16639	1	2 *	0.0766	0.9234
16651	2	1 *	0.7796	0.2204
16654	2	1 *	0.8288	0.1712
16664	2	1 *	0.9960	0.0040
16691	2	1 *	0.5211	0.4789
16647	2	1 *	0.5284	0.4716
16640	2	1 *	0.6736	0.3264
16678	2	1 *	0.5062	0.4938
16680	2	1 *	0.6419	0.3581
16694	2	1 *	0.5956	0.4044
16679	2	1 *	0.7970	0.2030
16686	2	1 *	0.6006	0.3994
16681	2	1 *	0.6740	0.3260
16646	2	1 *	0.6936	0.3064
16695	2	1 *	0.5826	0.4174
16690	2	1 *	0.5330	0.4670
16645	2	1 *	0.7240	0.2760
16672	2	1 *	0.9395	0.0605
16712	2	1 *	0.8557	0.1443

Procedimiento DISCRIM
Resumen de clasificación para los datos calibrados: WORK.CLADOS
Resumen de validación cruzada usando Función discriminante lineal

Función de la distancia cuadrada generalizada

$$D_j^2(X) = (X - \bar{X}_j)' \text{COV}^{-1}(X) (X - \bar{X}_j)$$

Probabilidad posterior de miembro en cada Grupo

$$\text{Pr}(j|X) = \frac{\exp(-.5 D_j^2(X))}{\sum_k \exp(-.5 D_k^2(X))}$$

Número de observaciones y porcentaje clasificado en Grupo

De Grupo	1	2	Total
1	24 66.67	12 33.33	36 100.00
2	18 28.13	46 71.88	64 100.00
Total	42 42.00	58 58.00	100 100.00
Anteriores	0.5	0.5	

Estimaciones de cuenta de error para Grupo

	1	2	Total
Tasa	0.3333	0.2813	0.3073
Anteriores	0.5000	0.5000	

APÉNDICE 3 / APPENDIX 3

A.- Valores para los parámetros de probabilidad obtenidos en el análisis bayesiano (MC3).

A.1.- Resumen valores análisis bayesiano para el árbol filogenético combinado de 3 regiones, Árbol A -RPB1, ITS nu y LSU mt- de la Figura 3.3.

LnL= -8260.293 (\pm 0.108).

TL= 2.839 (\pm 0.0044).

-Frecuencia de bases para la región RPB1:

$\pi(A) = 0.283$ (\pm 0.00009) $\pi(C) = 0,249$ (\pm 0.00008) $\pi(G) = 0,265$ (\pm 0.00009)

$\pi(T) = 0.200$ (\pm 0.00007)

$r(AC) = 0.083$ (\pm 0.0001) $r(CG) = 0.046$ (\pm 0.00008)

$r(AG) = 0,215$ (\pm 0.0002) $r(CT) = 0,499$ (\pm 0.0003)

$r(AT) = 0.097$ (\pm 0.0001) $r(GT) = 0.057$ (\pm 0.0001)

Gamma determinada por el parámetro alfa= 0.381 (\pm 0.0004)

p-invar = 0.389 (\pm 0.0006).

-Frecuencia de bases para la región ITS nu:

$\pi(A) = 0.209$ (\pm 0.0001) $\pi(C) = 0,319$ (\pm 0.0001) $\pi(G) = 0,259$ (\pm 0.0001)

$\pi(T) = 0.221$ (\pm 0.00009)

$r(AC) = 0.063$ (\pm 0.00006) $r(CG) = 0.045$ (\pm 0.00008)

$r(AG) = 0,265$ (\pm 0.0002) $r(CT) = 0,512$ (\pm 0.0003)

$r(AT) = 0.068$ (\pm 0.00009) $r(GT) = 0.046$ (\pm 0.00007)

Gamma determinada por el parámetro alfa= 0.296 (\pm 0.000112)

p-invar = 0.954 (\pm 0.00127).

-Frecuencia de bases para la región LSU mt:

$\pi(A) = 0.347$ (\pm 0.0001) $\pi(C) = 0,157$ (\pm 0.00008) $\pi(G) = 0,172$ (\pm 0.00008)

$\pi(T) = 0.322$ (\pm 0.0004)

$r(AC) = 0.0269$ (\pm 0.00008) $r(CG) = 0.0869$ (\pm 0.0002)

$r(AG) = 0,285$ (\pm 0.0004) $r(CT) = 0.234$ (\pm 0.0003)

$r(AT) = 0.207$ (\pm 0.0002) $r(GT) = 0.159$ (\pm 0.0003)

Gamma determinada por el parámetro alfa= 0.118 (\pm 0.0001).

p-invar = 2.001 (\pm 0.0025).

A.2.- Resumen valores análisis bayesiano para el árbol filogenético combinado de 2 regiones, Árbol B -ITS nu y LSU mt- de la Figura 3.3.

$\text{LnL} = -6269.235 (\pm 0.098)$.

$\text{TL} = 8.096 (\pm 0.0073)$

-Frecuencia de bases para la región ITS nu:

$\pi(\text{A}) = 0.229 (\pm 0.00008)$ $\pi(\text{C}) = 0,293 (\pm 0.00008)$ $\pi(\text{G}) = 0,253 (\pm 0.00008)$

$\pi(\text{T}) = 0.223 (\pm 0.00007)$

$r(\text{AC}) = 0.078 (\pm 0.00007)$ $r(\text{CG}) = 0.062 (\pm 0.00006)$

$r(\text{AG}) = 0,239 (\pm 0.0001)$ $r(\text{CT}) = 0,486 (\pm 0.0002)$

$r(\text{AT}) = 0.079 (\pm 0.0001)$ $r(\text{GT}) = 0.052 (\pm 0.00007)$

Gamma determinada por el parámetro alfa = $0.61 (\pm 0.0004)$

p-invar = $1.41 (\pm 0.0003)$.

-Frecuencia de bases para la región LSU mt:

$\pi(\text{A}) = 0.334 (\pm 0.0001)$ $\pi(\text{C}) = 0,142 (\pm 0.0001)$ $\pi(\text{G}) = 0,182 (\pm 0.0001)$

$\pi(\text{T}) = 0.340 (\pm 0.0001)$

$r(\text{AC}) = 0.060 (\pm 0.0004)$ $r(\text{CG}) = 0.143 (\pm 0.0006)$

$r(\text{AG}) = 0,217 (\pm 0.0004)$ $r(\text{CT}) = 0.284 (\pm 0.0005)$

$r(\text{AT}) = 0.174 (\pm 0.0002)$ $r(\text{GT}) = 0.118 (\pm 0.0004)$

Gamma determinada por el parámetro alfa = $1.39 (\pm 0.0032)$.

p-invar = $0.465 (\pm 0.0004)$.

APÉNDICE 4 / APPENDIX 4

A.- Valores para los parámetros de probabilidad obtenidos en el análisis bayesiano (MC3).

A. 1.- Resumen valores análisis bayesiano para la Figuras 4.2 y 4.8 Árbol A.

$$\text{LnL} = -6711.09 (\pm 0.61)$$

$$\text{TL} = 3.172 (\pm 0.0109)$$

$$r(\text{AC}) = 0.115 (\pm 0.00019)$$

$$r(\text{CG}) = 0.094 (\pm 0.00015)$$

$$r(\text{AG}) = 0.214 (\pm 0.0002)$$

$$r(\text{CT}) = 0.294 (\pm 0.0002)$$

$$r(\text{AT}) = 0.148 (\pm 0.00019)$$

$$r(\text{GT}) = 0.132 (\pm 0.00129)$$

$$\text{Gamma determinada por el parámetro alfa} = 0.802 (\pm 0.001)$$

A. 2.- Resumen valores análisis bayesiano para la Figura 4.5 Árbol B.

$$\text{LnL} = -6714.49 (\pm 0.21)$$

$$\text{TL} = 0.6206 (\pm 0.0006)$$

-Frecuencia de bases para la región ITS nu:

$$\pi(\text{A}) = 0.213 (\pm 0.0002)$$

$$\pi(\text{C}) = 0.235 (\pm 0.0002)$$

$$\pi(\text{G}) = 0.273 (\pm 0.0002)$$

$$\pi(\text{T}) = 0.279 (\pm 0.0002)$$

$$r(\text{AC}) = 0.132 (\pm 0.0004)$$

$$r(\text{CG}) = 0.046 (\pm 0.17)$$

$$r(\text{AG}) = 0.27 (\pm 0.0005)$$

$$r(\text{CT}) = 0.272 (\pm 0.0005)$$

$$r(\text{AT}) = 0.169 (\pm 0.0003)$$

$$r(\text{GT}) = 0.11 (\pm 0.002)$$

$$\text{Gamma determinada por el parámetro alfa} = 1.019 (\pm 0.008)$$

$$p\text{-invar} = 0.109 (\pm 0.0015).$$

-Frecuencia de bases para la región *rbcL*:

$$\pi(\text{A}) = 0.271 (\pm 0.0001)$$

$$\pi(\text{C}) = 0.187 (\pm 0.0001)$$

$$\pi(\text{G}) = 0.216 (\pm 0.0001)$$

$$\pi(\text{T}) = 0.326 (\pm 0.0001)$$

$$r(\text{AC}) = 0.0475 (\pm 0.00031)$$

$$r(\text{CG}) = 0.048 (\pm 0.0003)$$

$$r(\text{AG}) = 0.28 (\pm 0.0011)$$

$$r(\text{CT}) = 0.443 (\pm 0.001)$$

$$r(\text{AT}) = 0.126 (\pm 0.0004)$$

$$r(\text{GT}) = 0.055 (\pm 0.0003)$$

$$\text{Gamma determinada por el parámetro alfa} = 102.0 (\pm 0.0087).$$

$$p\text{-invar} = 0.808 (\pm 0.001).$$

A. 3.- Resumen valores análisis bayesiano para la Figura 4.8.

$\text{LnL} = -5213.09 (\pm 1.58)$

$\text{TL} = 7.414 (\pm 0.1947)$

-Frecuencia de bases para la región ITS nu:

$\pi(\text{A}) = 0.223 (\pm 0.0002)$ $\pi(\text{C}) = 0.305 (\pm 0.0002)$ $\pi(\text{G}) = 0.264 (\pm 0.0004)$

$\pi(\text{T}) = 0.208 (\pm 0.0002)$

$r(\text{AC}) = 0.052 (\pm 0.0001)$

$r(\text{CG}) = 0.042 (\pm 0.0001)$

$r(\text{AG}) = 0.249 (\pm 0.0005)$

$r(\text{CT}) = 0.54 (\pm 0.0006)$

$r(\text{AT}) = 0.048 (\pm 0.0001)$

$r(\text{GT}) = 0.068 (\pm 0.0002)$

Gamma determinada por el parámetro alfa = $0.704 (\pm 0.004)$

p-invar = $0.162 (\pm 0.0016)$.

-Frecuencia de bases para la región LSU mt:

$\pi(\text{A}) = 0.344 (\pm 0.0004)$ $\pi(\text{C}) = 0.132 (\pm 0.0009)$ $\pi(\text{G}) = 0.17 (\pm 0.0006)$

$\pi(\text{T}) = 0.354 (\pm 0.0009)$

$r(\text{AC}) = 0.0487 (\pm 0.0006)$

$r(\text{CG}) = 0.108 (\pm 0.0011)$

$r(\text{AG}) = 0.269 (\pm 0.0016)$

$r(\text{CT}) = 0.274 (\pm 0.0011)$

$r(\text{AT}) = 0.158 (\pm 0.0031)$

$r(\text{GT}) = 0.142 (\pm 0.0005)$

Gamma determinada por el parámetro alfa = $0.124 (\pm 0.021)$.

p-invar = $0.162 (\pm 0.0016)$.

B.- Haplotipos de ITS nu de *Trebouxia jamesii* y *T. Angustilobata* de la Península Ibérica Fig. 4.4: correspondencia entre número de haplotipo, individuo/s, “morfo-especie” y localidad.

Haplotipo	Individuo	“Morfo-especie”	Localidad
Tang1	MAF-16643	<i>R. sphaerosporum</i>	N
	MAF-16645	<i>R. sphaerosporum</i>	N
	MAF-16664	<i>R. sphaerosporum</i>	G
	MAF-16671	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	G
	MAF-16691	<i>R. sphaerosporum</i>	L
	MAF-16695	<i>R. tinei</i>	L
	MAF-16698	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	L
	MAF-16741	<i>R. macrosporum</i>	SF
Tang2	MAF-16696	<i>R. riparium</i> subsp. <i>riparium</i>	L
	MAF-16713	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	SE
Tang3	MAF-16635	<i>R. macrosporum</i>	N
Tang4	MAF-16668	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	G
Tang5	MAF-16734	<i>R. sublucidum</i>	SF
Tang6	MAF-16738	<i>R. drepanodes</i>	SF
Tang7	MAF-16707	<i>R. sublucidum</i>	SE
Tang8	MAF-16704	<i>R. tavaresii</i>	SE
Tang9	MAF-16690	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	L
Tang10	MAF-16659	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i>	G
Tang11	MAF-16660	<i>R. sublucidum</i>	G
Tang12	MAF-16672	<i>R. lecanorinum</i>	G
Tjam1	MAF-16646	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	N
	MAF-16647	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	N
	MAF-16719	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>	Pi
	MAF-16725	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	Pi
Tjam2	MAF-16663	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i>	G
Tjam3	MAF-16677	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	SN
Tjam4	MAF-16639	<i>R. sublucidum</i>	N
Tjam5	MAF-16717	<i>R. tinei</i>	Pi
Tjam6	MAF-16732	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	SF
Tjam7	MAF-16667	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	G
Tjam8	MAF-16666	<i>R. geographicum</i> . subsp. <i>frigidum</i>	G
Tjam9	MAF-16737	<i>R. macrosporum</i>	SF
Tjam10	MAF-16718	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>	Pi
Tjam11	MAF-16642	<i>R. tinei</i>	N

C.- Haplotipos de ITS y *rbcL* del fotobionte a nivel mundial Fig. 4.7: correspondencia entre número de haplotipo, individuo/s, “morfo-especie” y localidad.

C.1- Haplotipos de la región ITS nu.

Haplotipo	Individuo	“Morfo-especie”	Localidad
Thap1	MAF-17603	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>	Sv
	MAF-17604	<i>R. macrosporum</i>	Sv
	MAF-17613	<i>R. macrosporum</i>	Sv
	MAF-17633	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>	Al
	MAF-17634	<i>R. tinei</i>	Al
	MAF-17636	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	Al
	MAF-17637	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	Al
	MAF-17638	<i>R. tavaresii</i>	Al
	MAF-17653	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	Mx
	MAF-17655	<i>R. macrosporum</i>	Mx
	MAF-17656	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	Mx
	MAF-17657	<i>R. macrosporum</i>	Mx
	MAF-17691	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	AnM
	MAF-17692	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>	AnM
MAF-17698	<i>R. tinei</i>	AnM	
Thap2	MAF-17606	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	Sv
Thap3	MAF-17684	<i>R. ferax</i>	TF
Thap4	MAF-17689	<i>R. macrosporum</i>	AnM
Thap5	MAF-17696	<i>R. sublucidum</i>	AnM
Thap6	MAF-17693	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>	AnM
Thap7	MAF-17651	<i>R. macrosporum</i>	Mx
Thap8	MAF-17652	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	Mx
Thap9	MAF-17635	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	Al
Thap10	MAF-16667	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	PI
Thap11	MAF-16666	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	PI
Thap12	MAF-17672	<i>R. tinei</i>	Ch
Thap13	MAF-17674	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>	Ch
Thap14	MAF-17675	<i>R. macrosporum</i>	Ch
	MAF-17676	<i>R. tinei</i>	TF
	MAF-17681	<i>R. tinei</i>	TF
Thap15	MAF-17679	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	TF
Thap16	MAF-17680	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>	TF
Thap17	MAF-17671	<i>R. sublucidum</i>	Ch
Thap18	MAF-16659	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i>	PI
Thap19	MAF-16672	<i>R. lecanorinum</i>	PI
Thap20	MAF-16668	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	PI
Thap21	MAF-16664	<i>R. sphaerosporum</i>	PI
Thap22	MAF-16660	<i>R. sublucidum</i>	PI
Thap23	MAF-17730	<i>R. drepanodes</i>	I
	MAF-17734	<i>R. sphaerosporum</i>	I
	MAF-17738	<i>R. sublucidum</i>	I
Thap24	MAF-17731	<i>R. sphaerosporum</i>	I
	MAF-17735	<i>R. tavaresii</i>	I
	MAF-17736	<i>R. macrosporum</i>	I
Thap25	MAF-17654	<i>R. tinei</i>	Mx
Thap26	MAF-17739	<i>R. lecanorinum</i>	I
Thap27	MAF-17607	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	Sv
Thap28	MAF-17678	<i>R. riparium</i> subsp. <i>riparium</i>	TF
Thap29	MAF-17670	<i>R. ferax</i>	Ch

C.2- Haplotipos de la región *rbcL*.

Haplotipo	Individuos	“Morfo-especie”	Localidad
Thap1	MAF-17603	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>	Sv
	MAF-17604	<i>R. macrosporum</i>	Sv
	MAF-17613	<i>R. macrosporum</i>	Sv
	MAF-17634	<i>R. tinei</i>	Al
	MAF-17635	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	Al
	MAF-17636	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	Al
	MAF-17637	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	Al
	MAF-17638	<i>R. tavaresii</i>	Al
	MAF-17651	<i>R. macrosporum</i>	Mx
	MAF-17653	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	Mx
	MAF-17656	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	Mx
	MAF-17671	<i>R. sublucidum</i>	Ch
	MAF-17672	<i>R. tinei</i>	Ch
	MAF-17679	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	TF
	MAF-17680	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>	TF
	MAF-17681	<i>R. tinei</i>	TF
	MAF-17684	<i>R. ferax</i>	TF
	MAF-17679	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	TF
	MAF-17680	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>	TF
	Thap2	MAF-17633	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>
MAF-17674		<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>	Ch
Thap3	MAF-17675	<i>R. macrosporum</i>	Ch
	MAF-17692	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>	AnM
	MAF-17693	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>	AnM
Thap4	MAF-17676	<i>R. tinei</i>	TF
Thap5	MAF-16666	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	PI
	MAF-16667	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	PI
Thap6	MAF-16659	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i>	PI
	MAF-16660	<i>R. sublucidum</i>	PI
	MAF-16664	<i>R. sphaerosporum</i>	PI
	MAF-16668	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	PI
Thap7	MAF-17655	<i>R. macrosporum</i>	Mx
Thap8	MAF-17689	<i>R. macrosporum</i>	AnM
Thap9	MAF-17691	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>	AnM
Thap10	MAF-17657	<i>R. macrosporum</i>	Mx
	MAF-17696	<i>R. sublucidum</i>	AnM
Thap11	MAF-16672	<i>R. lecanorinum</i>	PI
Thap12	MAF-17652	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>	Mx
Thap13	MAF-17678	<i>R. riparium</i> subsp. <i>riparium</i>	TF
	MAF-17730	<i>R. drepanodes</i>	I
	MAF-17731	<i>R. sphaerosporum</i>	I
	MAF-17734	<i>R. sphaerosporum</i>	I
	MAF-17735	<i>R. tavaresii</i>	I
	MAF-17736	<i>R. macrosporum</i>	I
	MAF-17739	<i>R. lecanorinum</i>	I
Thap14	MAF-17738	<i>R. sublucidum</i>	I
Thap15	MAF-17654	<i>R. tinei</i>	Mx
Thap16	MAF-17607	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>	Sv
Thap17	MAF-17670	<i>R. ferax</i>	Ch

APÉNDICE 5 / APPENDIX 5

A.- Localidades y coordenadas de muestreo a nivel mundial.

Se proporcionan las localidades y coordenadas de los individuos del grupo de *R. geographicum* así como de los individuos de otros grupos del subgénero *Rhizocarpon* incluidos, con una distribución mundial, utilizados en los análisis del Capítulo 4 y 5. Los individuos utilizados en el análisis del fotobionte del Capítulo 4 son marcados con un *. Para los análisis realizados en el Capítulo 4 se consideraron 5 localidades de muestreo: Sv, Al, Mx₁, Ch₂ e I, junto con 3 localidades más Sv, TF y AnM considerándose cada una como una sola localidad por la proximidad entre los muestreos y la escasez de material. En los análisis del Capítulo 5 se consideraron estas 13 grandes áreas con las correspondientes localidades que se indican en cada caso. En gris se indican los individuos de otros grupos incluidos en los análisis del Capítulo 5.

A.-1.- Noruega, Islas Svalbard, Longyearbyen (Sv₁, Sv₂, Sv₃, Sv₄).

Recolector: Sancho L.G & Pintado A.

Localidad / Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
Longyearbyen/ 78° 13,2'N, 15° 36,5'E/ 63,4 m/ 27-06-2007 (Sv ₁)	MAF-17603*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>
	MAF-17604*	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17605	<i>R. tinei</i>
	MAF-17613*	<i>R. macrosporum</i>
Nevero próximo al Hotel Svalbard/ 78° 12,5'N, 15° 37,4'E/ 85,6 m/ 26-06-2007 (Sv ₂)	MAF-17606*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
	MAF-17607*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
	MAF-17608	<i>R. tinei</i>
Kapp Linné/ 77° 59,7'N, 12° 44,9'E/ 145,4 m/ 02-07-2007 (Sv ₃)	MAF-17610	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
	MAF-17611	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>
	MAF-17612	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
	MAF-17614	<i>R. inarense</i>
Morrena Glaciar Linné/ 77° 58.8'N, 13° 54.2'E/ 102.7 m/ 04-07-2007 (Sv ₄)	MAF-17609	<i>R. macrosporum</i>

A.-2.- Reino Unido, Escocia, Isla Skye (Ec).

Recolector: Fernández-Mendoza F., Pérez-Ortega S. & Vivas M.

Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
57° 12' 55,20"N, 5° 50' 19,26"O/ 70 m/ 10-08-2010	MAF-17615	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i>
	MAF-17616	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>
	MAF-17617	<i>R. tinei</i>
	MAF-17618	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17619	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17620	<i>R. tinei</i>
	MAF-17621	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
	MAF-17622	<i>R. lecanorinum</i>

A.3.- España, Islas Canarias (M₁, M₂, M₃, M₄).

Localidad / Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección/ Recolector	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
La Palma, Subida al refugio del Pilar/ 28° 38'N, 17° 38'O/ 1103 m/ 25-08-2009/ Amo de Paz G. (M ₁)	MAF-17623	<i>R. tinei</i>
	MAF-17624	<i>R. tavaresii</i>
	MAF-17625	<i>R. tinei</i>
La Palma, Carretera al Roque, pasado el cruce al Pico de la Nieve/ 28° 44' 33.2''N, 17° 49' 37.1''O/ 1993 m/ 25-06-2009/ Crespo A. (M ₁)	MAF-17626	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17627	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17628	<i>R. tinei</i>
La Gomera, Carretera de Alajeró/ 28° 3' 38.10''N, 17° 14' 27.14''O/ 800 m/ 04-08-2009/ Crespo A. (M ₂)	MAF-17629	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17630	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
Gran Canaria, Vega de San mateo a Tenteniguada/ 29° 59' 43.2''N, 15° 31' 54.5''O/ 976m/ 17-06-2009/ Crespo A. (M ₃)	MAF-17631	<i>R. sublucidum</i>
Gran Canaria, Valleseco/ 28° 01' 29.9''N, 15° 35' 55.3''O/ 1305 m/ 18-06.-2009/ Crespo A. (M ₃)	MAF-17632	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>
Tenerife, junto al Mirador de Ortuño/ 28° 24' 11.1''N, 16° 25' 22.5''O/ 1590 m/ 21-06-2009/ Crespo A. (M ₄)		

A.4.- Estados Unidos, Alaska, Klondike Gold Rush National Historical Park, Skagway (A1).

Recolector: Pérez-Ortega S.

Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
59° 40,18'N, 135° 15,86'O/ 442 m / 27-07-2008	MAF-17645	<i>R. macrosporum</i>
59° 40.3'N, 135° 15.8'O/ 454 m/ 27-07-2008	MAF-17644	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>
59° 36.8'N, 135° 08.8'O/ 935 m/ 01-08-2008	MAF-17638*	<i>R. tavaresii</i>
59° 36.8'N, 135° 09'O/ 948 m/ 01-08-2008	MAF-17633*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>
	MAF-17637*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
59° 37'N, 135° 09'O/ 1011 m/ 30-07-2008	MAF-17641	<i>R. saanaense</i>
	MAF-17640	<i>R. lecanorinum</i>
59° 37'N, 135° 09'O/ 1019 m/ 30-07-2008	MAF-17636*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
	MAF-17634*	<i>R. tinei</i>
59° 37.1'N, 135° 09'O/ 1078 m/ 31-07-2008.	MAF-17642	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i>
	MAF-17643	<i>R. tinei</i>
59° 37,2'N, 135° 09,4'O/ 1079 m/ 31-07-2009	MAF-17635*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
	MAF-17639	<i>R. riparium</i> subsp. <i>riparium</i>

A.5.- Estados Unidos (EU₁, EU₂).

Localidad/ Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección/ Recolector	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
Montañas Rocosas, Colorado, Condado de Chaffee/ 38°49' 39.93"N, 106° 24' 19.59"O/ 3691 m/ 01-08-2009/ Fernández-Mendoza F. (EU ₁)	MAF-17646	<i>R. dispersum</i>
	MAF-17647	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17648	<i>R. dispersum</i>
	MAF-17649	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
California, Sequoia National Park/ 36° 37'N, 118° 49'O/ 2100 m/ 23-07-2008/ Amo de Paz G. (EU ₂)	MAF-17650	<i>R. sphaerosporum</i>

A.6.- México, Volcán Iztaccíhuatl (Mx₁, Mx₂).

Recolector: Roca-Valiente B.

Localidad / Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
Morrena del Glaciar Ayoloco/ 19° 9' 58''N, 98° 38' 46''O/ 4687 m/ 04-11-2008 (Mx ₁)	MAF-17651*	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17652*	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>
	MAF-17653*	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>
	MAF-17654*	<i>R. tinei</i>
	MAF-17655*	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17656*	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>
	MAF-17657*	<i>R. macrosporum</i>
Subida al volcán/ 19° 9' 12.1''N, 98° 38' 37.5''O/ 4400 m/ 05-11- 2008 (Mx ₂)	MAF-17658	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>
	MAF-17659	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
	MAF-17660	<i>R. tinei</i>
	MAF-17661	<i>R. tavaresii</i>
	MAF-17662	<i>R. lecanorinum</i>
	MAF-17663	<i>R. sublucidum</i>

A.7.- Chile, Cordillera de los Andes (Ch₁, Ch₂).

Recolector: Pérez-Ortega S. & Fernández-Mendoza F.

Localidad / Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
Región de la Araucanía Pucón. Volcán Villarica/ 39° 23' 51"S, 71° 56' 45"O, 1593 m/ 31-03- 2009 (Ch ₁)	MAF-17664	<i>R. lecanorinum</i>
	MAF-17665	<i>R. sublucidum</i>
	MAF-17666	<i>R. lecanorinum</i>
	MAF-17667	<i>R. macrosporum</i>
Región del Maule. Paso de Pino Hachado 38° 39' 27"S, 70° 53' 47"O. 1987 m/ 01-04-2009 (Ch ₂)	MAF-17670*	<i>R. ferax</i>
	MAF-17671*	<i>R. sublucidum</i>
	MAF-17672*	<i>R. tinei</i>
	MAF-17673	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
	MAF-17674*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>
MAF-17675*	<i>R. macrosporum</i>	

A.8.- Chile, Tierra de Fuego (TF₁, TF₂, TF₃).

Recolector: Pérez-Ortega S.

Localidad / Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
Parque Nacional de Pali Aike/ 52° 5' S, 69° 42' O/ 195 m/ 12-01-2008 (TF ₁)	MAF-17678*	<i>R. riparium</i> subsp. <i>riparium</i>
Lago Balmaceda/ 51° 56' 2'' S, 72° 23' 17'' O/ 138 m/ 14-01-2008 (TF ₂)	MAF-17680*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>
	MAF-17676*	<i>R. tinei</i>
Parque Nacional de las Torres del Paine. Lago Sarmiento/ 51° 2' 57'' S, 72° 56' 11'' O/ 160 m/ 16-01-2008 (TF ₂)	MAF-17677	<i>R. superficiale</i> subsp. <i>boreale</i>
	MAF-17679*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
Islotes Holger/ 54° 56' 28'' S, 67° 15' 3'' O/ 0 m/ 22-01-2008 (TF ₃)	MAF-17681*	<i>R. tinei</i>
	MAF-17682	<i>R. tinei</i>
Frente a la Isla Snipe/ 54° 57' 41'' S, 67° 11' 36'' O/ 0 m/ 23-01-2008 (TF ₃)	MAF-17683	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>prospectans</i>
Isla Pickton/ 54° 55' 48'' S, 67° 3' 11'' O/ 0 m/ 23-01-2008 (TF ₃)	MAF-17687	<i>R. tinei</i>
Subida a los Dientes de Navarino/ 54° 58' 11'' S, 67° 33' 27'' O/ 693 m/ 25-01-2008 (TF ₃)	MAF-17684*	<i>R. ferax</i>
Puerto Navarino frente a la Isla Hoste/ 54° 55' 48'' S, 68° 20' 45'' O/ 0 m/ 27-01-2008 (TF ₃)	MAF-17685	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>
	MAF-17686	<i>R. tinei</i>

A.9.- Antártida Marítima, Isla Livingston (AnM₁, AnM₂).

Recolector: Raggio P.

Localidad / Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
Pico Radio/ 62° 39.92' S, 60° 23.84' O/ 130 m/ 01-01-2009 (AnM ₁)	MAF-17690	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
	MAF-17691*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
	MAF-17692*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>
	MAF-17693*	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>
Caleta Española/ 62° 39.74'' S, 60° 23.26' O/ 25 m/ 5-01-2009 (AnM ₂)	MAF-17688	<i>R. lecanorinum</i>
	MAF-17689*	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17694	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17695	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
	MAF-17696*	<i>R. sublucidum</i>
	MAF-17697	<i>R. tavaresii</i>
	MAF-17698*	<i>R. tinei</i>

A.10.- Antártida Continental, Victoria Land, Monte Kyffin (AnC).

Recolector: Sancho L.G.

Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
83° 48.06'' S, 172° 13.25' E/ 606 m/ 19-01-2011	MAF-17701	<i>R. nidificum</i>
	MAF-17702	<i>R. nidificum</i>
	MAF-17703	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>
	MAF-17704	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>arcticum</i>
	MAF-17705	<i>R. nidificum</i>
Ibidem/ 05-01-2003	MAF-17700	<i>R. adarensis</i>

A.11.- Nueva Zelanda, Styx Creek, Central Otajo (Nz).

Recolector: Vivas M.

Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
45° 28'S, 169° 58'E/ 1100m/ 02-02-2011	MAF-17706	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>
	MAF-17707	<i>R. riparium</i> subsp. <i>lindsayanum</i>
	MAF-17708	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17709	<i>R. tinei</i>
	MAF-17710	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
	MAF-17711	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
	MAF-17712	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
	MAF-17713	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
	MAF-17714	<i>R. tinei</i>
	MAF-17715	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>geographicum</i>
	MAF-17716	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>frigidum</i>
	MAF-17717	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>

A.12.- Taiwan, Monte Nanhu (Tw₁, Tw₂)

Recolector: Ohmura Y.

Localidad/Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
Cima del Monte Nanhu/ 24° 21' 38.2''N, 121° 26' 27.3''E/ 3712 m/ 03-10-2010 (Tw ₁).	MAF-17718	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17719	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17720	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17721	<i>R. tinei</i>
	MAF-17722	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
	MAF-17723	<i>R. sublucidum</i>
Subida al Monte Nanhu/ 24° 22' 52.9''N, 121° 25' 15''E/ 3175 m/ 01-10-2010 (Tw ₂)	MAF-17724	<i>R. sublucidum</i>
	MAF-17725	<i>R. tavaresii</i>
	MAF-17726	<i>R. lecanorinum</i>
	MAF-17727	<i>R. lecanorinum</i>
	MAF-17728	<i>R. geographicum</i> subsp. <i>diabasicum</i>
	MAF-17729	<i>R. tinei</i>

A.13.- India, Uttaranchal, Badhrinath, en el camino de Manas a las Cataratas de Vasundhara (I).

Recolector: Divakar P.

Coordenadas/ Altitud/ Fecha de recolección	Cód. Herbario	Binomen "morfo-especie"
30° 47' 40,15"N, 79° 29' 32,57"E/ 3600 m/ 21-08-2007	MAF-17730*	<i>R. drepanodes</i>
	MAF-17731*	<i>R. sphaerosporum</i>
	MAF-17732	<i>R. sublucidum</i>
	MAF-17733	<i>R. sublucidum</i>
	MAF-17734*	<i>R. sphaerosporum</i>
	MAF-17735*	<i>R. tavaresii</i>
	MAF-17736*	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17737	<i>R. macrosporum</i>
	MAF-17738*	<i>R. sublucidum</i>
	MAF-17739*	<i>R. lecanorinum</i>

B.- Tablas observaciones anatómicas materiales propios.

Se han ordenado según su aparición en el árbol filogenético de la Fig. 5.3.a y b.

Nº MAF	Dap	CSp			LgSp			AnSp			KOH
	med	med	min	max	med	min	max	med	min	max	
16722	1004	15	14	16	35,1	31,09	40,9	15,8	14,5	17	1
16721	751,7	8,17	7	10	27	24,66	32	12,2	9,89	14,7	1
16668	577,2	11,8	10	14	37,6	26,56	43,8	15,7	11	20	1
16726	687,6	10,2	8	12	28,8	26	31,2	13,7	12	17,1	1
17649	685,3	9,75	8	12	26,7	24,27	28,8	15,2	14,7	15,7	1
16655	1302	12,5	9	15	30,2	26,67	32,7	17,4	15,1	18,7	1
17616	345,4	12,3	12	13	32,5	30,31	35,1	17,5	15,4	20,9	1
17622	600	14	12	16	32	31,73	32,3	13,9	13,3	14,5	0
17621	300	17	14	20	38,5	34,42	41,1	16,4	15,5	17,4	1
17618	626,9	20,5	14	26	38	32,21	40,9	18,3	15,2	22,3	1
17619	386,4	22,8	18	26	31,7	28,63	36,1	15,2	12,7	17,7	1
17615	579,8	9,33	8	10	28,7	24,4	32	15,1	12,9	17,4	1
17617	962,5	13,5	12	16	32,3	26,9	36,1	13,5	11,8	16	1
17620	864,3	18,5	18	20	32	29,62	34,4	14,9	13,9	16	1
17626	500	19,8	18	22	35,1	33,51	36,2	14,2	13,7	15,4	0
17628	625,9	16,8	15	21	33,8	31,76	35,2	16,3	15,2	17,2	1
17627	394,4	18,2	16	21	32,1	31,76	32,9	18,9	17,2	20	0
17630	433,3	13,3	12	15	34,5	31,27	37,4	15,5	14,7	16,3	1
17632	501,5	17,3	16	19	30,9	28,77	33,2	16,9	16,4	18	0
17631	653,8	30,3	29	32	42,2	40,85	43,8	21	20,3	21,6	1
17704	573,4	6,33	6	7	19,8	18,95	21,2	11,3	10,3	12,4	1
17703	534,2	6,5	6	8	20,2	19,39	20,7	11,2	10,5	11,6	1
17701	266,7	5,5	5	6	20	19,68	20,3	11,9	11,3	12,4	1
17702	310	4,4	3	6	18	16	18,9	11,2	10,9	11,7	1
17705	898,9	3,5	3	5	17,4	15,35	18,6	10,6	8,82	12,5	1
17611	828,1	10	8	12	25,6	24,25	26,4	12,4	10,9	13,7	1
17674	900,2	7,75	6	10	23,4	22,7	24,7	12,4	12,3	12,4	1
17713	1077	11,5	7	15	27,9	26,36	29,7	15,3	12,8	17,3	1
17717	870,7	12	8	14	29,8	29,13	30,6	15,5	14,7	16,1	1
17710	953,1	9,5	8	10	28	26,44	29,8	15,4	14,1	16,7	1
17711	707,1	9,5	7	12	28,7	26,79	31,4	12,8	10,3	14,6	1
17716	549,1	10	8	12	26,8	25,49	28,2	14,6	14,2	15,2	1
17715	490,5	10,8	10	12	29,8	27,78	32,3	13,5	13,2	13,9	1
17714	970,5	15	12	18	31,6	29,66	34,3	14,4	14	14,8	1
17636	864,1	8,67	8	10	27	25,57	28,1	14,4	12,3	16,1	1
17683	688,2	8,83	8	10	26,6	21,82	31,4	12,4	11	14,5	1
17680	604,7	7,17	6	8	25	23,5	29,9	12,1	10,9	13,8	1
17685	734,8	9,5	7	12	28,9	24,79	35,9	13,1	10,1	14,9	1
17687	732,1	12,8	12	14	30,3	27,96	34	12,4	11,9	13,2	1
17691	492,1	10,3	8	13	26,8	23,9	30,1	13,9	10,8	15,9	1
17692	733,1	7	6	8	26,4	22,65	31,1	13,2	12,5	15,3	1
17693	332,2	6,17	5	7	27,7	22,8	29,3	12,9	11,2	15,5	1
17660	1026	18	16	21	43,6	39,47	48,9	15,1	13,9	16,4	1
17659	855,1	16,3	15	18	32,9	31,36	35,8	12,9	12,6	13,4	1
17661	887,5	17,3	15	20	35,9	31,7	38,3	12,4	11,5	13,3	0
17642	610	12	10	14	30,1	26,35	32,7	15,8	14,6	16,7	1

Tabla B.1.a.- Observaciones de los individuos del Linaje I. Diámetro del apotecio (DAP), Número de células por espora (CSp), Longitud de las esporas (LgSp), Anchura de las esporas (AnSp) y reacción del epihimnio a la KOH (1= positiva, 0= negativa).

N° MAF	DAp	CSp			LgSp			AnSp			KOH
	med	med	min	max	med	min	max	med	min	max	
17634	742,4	12,5	10	15	29,2	24,1	37,4	13,49	11,6	15,6	1
17637	702,6	11,3	9	13	30,5	28	32,7	12,98	11	15,3	1
17644	803,3	13,3	12	14	27,9	25,2	31,1	12,33	10,1	14,8	1
16662	708,9	9,83	8	12	32,4	29,4	35,6	14,67	12,6	16,9	1
16719	825,5	9,5	6	12	28,8	24,2	36,7	12,86	11,7	14,2	1
16663	870,7	9,17	6	12	28,5	23,8	32,1	12,57	10,7	14,9	1
16717	788,6	11,3	8	14	30,6	25,4	36,4	15,09	13	17,2	1
17612	814,8	13,3	12	14	33,9	33	35,6	15,69	13,9	18	1
17658	402	17	16	18	34,7	31,8	38,2	15,11	13,2	16,4	0
17728	905	19	17	20	30,2	28,7	31,9	15,34	14,8	16,1	1
17729	741,9	19	18	20	26,9	24,7	29,1	17,38	16,3	18,8	1
17712	1352	16,5	14	20	26,3	25,5	26,8	15,38	13,8	17,7	1
17633	618,9	8,67	8	10	26,6	18,9	31,3	14,26	12,5	17,3	1
17695	1043	13,2	10	16	31	24,9	37,7	15,27	13,3	18	1
17679	773,5	9,5	7	12	30,1	26,6	40,1	13,98	13,3	15	1
17647	795,9	20,2	18	22	27,2	25,2	29,2	14,09	13	15,6	0
17686	764,6	13,8	12	15	26,1	20,4	34,9	13,77	12,1	17,8	1
17690	963,5	9,5	6	13	31,3	27,1	35,6	13,58	12,2	15,9	1
17610	113	12,5	11	15	33,5	30,2	35,5	13,3	12,2	14,1	1
17676	623,5	16	13	18	33,4	30,7	34,9	16,32	15,5	17,1	1
17681	856,4	13,5	11	18	32,6	26,9	40,6	12,72	9,9	13,5	1
17682	899,6	16,2	12	20	30,1	28,5	32,1	12,88	11,5	14,7	1

Tabla B.1.a.- Continuación.

Nº MAF	DAP	CSp			LgSp			AnSp			KOH
	med	med	min	max	med	min	max	med	min	max	
16651	665,2	24,3	21	30	39,2	31,19	49,9	16,78	14,6	19,5	0
17624	613,7	20,8	19	22	34,4	29,7	39	18,02	15,5	21,1	0
17623	389,7	16	15	17	26,4	25,9	26,9	14,62	14	15,2	1
17625	673,7	21	17	23	31,8	29,54	36,5	18,42	16,7	19,6	0
17629	608,2	23,3	22	26	35,9	35,04	37,1	19,83	18,6	20,5	0
16670	743	28	24	30	41,1	36,62	49,1	17,57	16	18,9	0
17664	1058	29,8	27	31	44,3	38,83	49,9	17,25	15,7	18,2	0
17666	289,2	19,3	18	22	32	29,84	37,5	15,45	13,9	19,1	0
17667	568,1	24,6	22	27	46,2	41,35	49,3	17,97	16,3	19,9	0
17665	443,8	30,6	28	33	47,5	43,96	56,5	22,69	19,8	24,2	0
16636	595	17,8	12	22	35,4	32,33	38,5	17,54	16,4	18,8	0
16664	1094	13	8	18	32,6	25,96	42,8	13,7	12	16,6	0
16658	601,8	17,5	15	20	36,5	28,54	46,3	16,68	12,9	23,6	0
17639	413,3	13	12	15	36,6	34,54	38,2	18,3	17,5	18,8	0
16654	847,3	17,5	16	20	33,4	28,34	39	15,75	13,6	19,3	1
16666	847,1	10,3	8	12	30	27,43	32,7	16,41	14,7	19,4	1
16656	679,4	16,3	14	19	33,6	30,1	36,8	15,86	14	18,1	0
17604	793,5	19	17	20	35,8	35,38	36	12,42	10,8	13,3	0
17609	450	19,8	16	22	35	32,64	37,1	12,7	12,3	13	0
17638	756,2	20,8	16	26	42,2	35,19	45,6	18	16,7	20,1	0
17635	981,2	12,7	9	15	32,6	24,33	38	15,98	13,7	17,8	1
17718	625	23,8	16	28	38,8	30,93	44,4	14,26	13,1	15,5	1
17707	669,1	14,3	13	15	27	25,81	28,2	12,68	11,9	13,8	0
17725	532	20,8	18	24	33	30,5	35,8	14,68	13,6	16,2	1
17726	1073	18	16	20	30,9	30,07	31,8	14,79	14,3	15,6	0
17727	746,2	18,7	18	20	31,4	30,85	32,4	14,55	13,2	16,2	1
17721	725,5	19,5	16	24	31,8	28,08	36,5	18,17	16,5	21,3	1
17640	670	19	18	20	32,9	30,47	34,4	15,91	14,9	17	0
17688	806,9	20,3	19	23	38,1	34,22	45,4	19,44	16,6	24,1	0
17698	631,1	20	16	23	35,3	32,66	38,9	15,65	13,8	16,9	1
17689	737,9	24,2	22	27	39,8	36,39	42,5	18,26	16,1	20	1
17694	612,9	22,5	20	25	39,7	37	45	18,39	17,6	19	1
17696	905,9	27,2	23	32	44,4	40,37	48,4	16,97	15,4	20,4	1
17697	744,6	27,5	25	31	38,3	36,34	42	16,07	15	18	0
17709	429,7	20	18	22	30,1	28,58	32,1	13,32	12,1	14	1
17708	977,5	27,3	26	30	40,5	37,74	43,1	18,23	16,9	19,9	1
17706	619,1	12	10	14	25,8	21,48	28,6	12,71	12,1	13	1
17643	436,7	20,7	20	22	29,2	28,11	31,4	13,64	13,1	14,1	1
16725	787	19,8	18	22	41,9	39,41	45,4	17,61	17,2	18	1
17641	633,3	24,7	22	27	28,6	25,6	30,4	14,87	13,4	16,5	1
17673	595,8	11,7	9	14	32,7	31,3	34,6	17,45	13,2	20,5	1
17722	750	11,5	10	13	28,1	25,03	30,1	12,53	12	12,9	1
17684	614,4	18,5	17	21	36,1	27,41	43,4	16,47	13,9	19,4	0
17650	711,7	14	12	16	37	33,81	40,3	15,29	13,9	16,8	0
17653	717,6	20,2	17	26	32,6	29,4	40,1	14,48	13,3	15,7	0
17655	735,3	22,3	20	24	42,1	39,33	46,3	17,13	15,5	19,6	0

Tabla B.1.b.- Observaciones de los individuos del Linaje II. Diámetro del apotecio (DAP), Número de células por espora (CSp), Longitud de las esporas (LgSp), Anchura de las esporas (AnSp) y reacción del epihimnio a la KOH (1= positiva, 0= negativa).

N° MAF	DAp	CSp			LgSp			AnSp			KOH
	med	med	min	max	med	min	max	med	min	max	
17606	708,3	16,5	15	19	32,7	29,7	35,4	15,6	13,1	17,36	1
17613	593	18,4	16	20	34,1	31,9	35,8	15,2	13	17,56	1
17607	797	16,6	14	20	32,3	26,5	38,7	16,3	14,7	17,74	1
17605	785,7	16,8	14	19	33,4	28,6	35,6	16,1	14,3	18,87	1
17608	859	16,6	14	20	34,9	32,9	38,6	16,9	13,7	18,81	1
17645	711,8	29,3	26	34	45,6	39,9	53,3	20	15,5	25,41	1
17730	604,5	23,2	20	25	38,6	32,6	44,6	19,2	14,8	22,98	0
16720	833,4	23,2	20	26	43,7	41,8	45,4	17,7	15,9	18,98	0
16727	586,2	23,7	22	26	39	35,1	42,8	19,5	17,4	21,77	0
17739	916,1	17,8	16	20	38,8	30,2	48,4	15	12,5	16,36	0
17736	587,5	34,6	29	40	46,8	44,7	49,3	17	14,5	19,08	1
17735	768,5	27	25	30	36	31,6	40,9	18,1	16,6	19,58	1
17671	611,2	19,4	18	21	39	36,5	42,6	17,9	17,6	18,42	0
17672	458,1	14	11	16	31	29,3	32,4	14,9	14,2	16,03	1
17678	782,3	17,8	15	21	33,6	29,5	38,6	16,3	14	18,21	0
17675	605,7	22	20	24	35,9	34,3	39	17,2	16,2	17,71	1
17670	342,9	15,8	14	19	37	32,6	41,2	19	16,9	20,37	0
17603	714,2	13,8	12	16	32,5	26	35,4	15,1	13,1	16,52	1
17656	661	19,3	16	21	35	32,1	41,5	17,3	16,4	19,61	1
17654	948,6	17,6	16	20	34,7	32,3	36,1	17,6	15,7	19,77	1
17657	632,7	20,5	18	24	35,9	32,5	39,5	19,5	18,4	21,72	1
17651	617,5	24,2	21	30	37,6	34,6	42,9	18,2	17,6	18,97	1
17652	848,6	20,3	18	24	34,6	31,3	38,8	15,3	14,1	17,08	0
17663	676,6	25,2	22	29	42,2	39,8	44,4	19	17,5	19,87	1
16714	1014	31,7	30	34	48,7	46,2	53,9	19,9	18,5	21,44	1
17662	843	32,8	30	35	44,9	43,1	48,5	21,1	19,9	22,97	1
17720	723,6	23	22	24	40,3	39,6	41,3	14,3	12,4	15,41	0
17723	936,1	23,8	18	28	41,6	32	47,9	17,3	15,7	19,52	1
17724	600	31,7	30	33	44,8	36,9	52,7	19,3	17,9	20,07	1
17719	476,4	30,3	28	33	38,5	33,7	42,2	19	18	20,9	0
17734	681,2	24	22	26	38	36	41,7	17,7	16	19,75	0
17732	538,5	23,3	22	25	36,2	28,7	45,1	20,2	17,2	23,82	0
17733	921,4	21,7	20	24	31,1	29,9	32,9	15,4	14,8	15,93	0
16723	639,9	30,8	26	38	43,6	35,6	49,2	22	18,9	26,84	0
16728	740,7	25	20	28	47	43,3	52,1	21,2	19,2	23,1	0
17731	703,8	17	15	19	30,5	26,1	40	18	13,9	20,44	0
17738	666,9	22,8	21	24	38	34,5	41,9	20,4	19,5	21,75	0
17737	826,8	23,3	17	26	34,8	30,2	44,2	18,3	14,1	20,51	0

Tabla B.1.b.- Continuación.

C.- Valores para los parámetros de probabilidad obtenidos en el análisis bayesiano (MC³) para las Figuras 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5.

$\ln L = -9391.994 (\pm 0.34)$

$TL = 29.22 (\pm 0.08)$

-Frecuencia de bases para la región ITS nu:

$\pi(A) = 0.212 (\pm 0.00009)$ $\pi(C) = 0.318 (\pm 0.0001)$ $\pi(G) = 0.268 (\pm 0.0001)$

$\pi(T) = 0.200 (\pm 0.00009)$

$r(AC) = 0.0774 (\pm 0.00006)$

$r(CG) = 0.046 (\pm 0.00003)$

$r(AG) = 0.261 (\pm 0.0001)$

$r(CT) = 0.496 (\pm 0.0002)$

$r(AT) = 0.0572 (\pm 0.00005)$

$r(GT) = 0.0672 (\pm 0.00005)$

Gamma determinada por el parámetro alfa = $0.72 (\pm 0.0007)$

p-invar = $0.217 (\pm 0.0003)$.

-Frecuencia de bases para la región LSU mt:

$\pi(A) = 0.349 (\pm 0.0002)$ $\pi(C) = 0.117 (\pm 0.0001)$ $\pi(G) = 0.170 (\pm 0.0001)$

$\pi(T) = 0.362 (\pm 0.0004)$

$r(AC) = 0.044 (\pm 0.0001)$

$r(CG) = 0.148 (\pm 0.0003)$

$r(AG) = 0.182 (\pm 0.0004)$

$r(CT) = 0.323 (\pm 0.0007)$

$r(AT) = 0.181 (\pm 0.0004)$

$r(GT) = 0.12 (\pm 0.0002)$

Gamma determinada por el parámetro alfa = $0.146 (\pm 0.00005)$.

p-invar = $0.50 (\pm 0.0004)$.