

GEA, FLORA ET FAUNA

Relacions entre diverses espècies de *Saxifraga* dels Pirineus i de les muntanyes Catalanídiques

Gemma Mas de Xaxars Giner*, Joan Vallès Xirau*, Teresa Garnatje Roca**, Arnau Mercadé López***, Joan Martín Villodre*, Pere Barnola Echenique****, Josep Vigo Bonada*****

* Laboratori de Botànica. Unitat associada CSIC. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona. Avinguda Joan XXIII s/n. 08028 Barcelona.

** Institut Botànic de Barcelona (IBB-CSIC-ICUB). Passeig del Migdia s/n, Parc de Montjuïc. 08038 Barcelona.

*** Departament de Biologia Vegetal. Unitat de Botànica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Avinguda Diagonal 643. 08028 Barcelona.

**** C/. Santa Rosa 46. 08470 Sant Celoni.

***** Secció de Ciències Biològiques. Institut d'Estudis Catalans. Carrer del Carme 47. 08001 Barcelona. A/e: jvigo@ub.edu

Rebut: 10.10.2012. Acceptat: 31.05.2014. Publicat: 27.06.2014

Resum

Vam seleccionar vuit espècies de la sèrie *Pentadactyles*, concretament, dues del Montseny-Guilleries (*S. genesiana* i *S. vayredana*), cinc de pirinenques (*S. geranioides*, *S. moschata*, *S. intricata*, *S. pentadactylis* i *S. pubescens*) i una (*S. fragilis*) de comuna als Pirineus i al sistema Catalanídic; com també alguns dels híbrids naturals entre aquestes. Per tal d'esbrinar-ne les relacions, ens hem centrat en quatre aspectes diferents: morfologia de l'aparell vegetatiu i de les flors; morfologia de detall i viabilitat del pol·len i les llavors; quantificació del DNA nuclear i recomptes cromosòmics.

Els resultats mostren que la quantitat de DNA discrimina bé els diferents tàxons entre ells i reflecteix adequadament la condició híbrida de les poblacions reputades com a tals. Els grans de pol·len i les llavors també proporcionen caràcters discriminants.

Pel que fa a la distinció entre *S. geranioides* i *S. genesiana*, el caràcter més decisiu és l'ornamentació de les llavors, les d'aquella solament amb macropapilles, les de *S. genesiana* amb micropapilles i macropapilles. El nombre cromosòmic és el mateix en un i altre tàxon ($2n = c. 44$). Hi ha molts indicis que la planta del Montseny (*S. genesiana*) s'originà de poblacions de *S. geranioides* dels Pirineus orientals.

Paraules clau: *Saxifraga*, Pirineus, Montseny-Guilleries, Cariologia, Hibridació.

Abstract

Relationships between several species of *Saxifraga* from the Pyrenees and the Catalanidic Mountains.

Our study concerns eight species of the section *Pentadactyles*, namely two (*S. genesiana* and *S. vayredana*) endemic of the Montseny-Guilleries massif, five (*S. geranioides*, *S. moschata*, *S. intricata*, *S. pentadactylis* and *S. pubescens*) growing in the Pyrenees, and one (*S. fragilis*) existing in both mountain ranges (Pyrenees and Catalanidic); as well as several natural hybrids between some of these taxa. In order to know the relationships among all them, we take in account vegetative and floral parameters, pollen and seed morphology and viability, nuclear DNA amount and chromosome numbers. The results show DNA content to be conclusive to differentiate all taxa and to detect hybrid populations. Pollen grains and seeds give also discriminative characters.

As regards the distinction between *S. geranioides* and *S. genesiana*, the sole important character is the seed ornamentation, consisting of micropapillae in the first taxon, while of mixed micropapillae and macropapillae in *S. genesiana*. The chromosomal number is the same ($2n = c. 44$) in both taxa. Results suggest that *S. genesiana* derived from a *S. geranioides* population of Eastern Pyrenees

Key words: *Saxifraga*, Pyrenees, Montseny-Guilleries, Karyology, Hybridization.

Introducció

A través d'un programa de recerca iniciat l'any 2010 hem pretès de dilucidar les relacions de parentiu entre diverses espècies de *Saxifraga* L. de la sèrie *Pentadactyles* (Lázaro Ibiza) P. Vargas de les muntanyes Catalanídiques i dels Pirineus; concretament, dues estirps del sistema Montseny-Guilleries (*S. genesiana* P. Vargas i *S. vayredana* Luiz.), una espècie comuna als Pirineus i a les muntanyes Catalanídiques (*S. fragilis* Schrank) i cinc de pirinenques (*S. geranioides* L.

s. str., *S. moschata* Wulf. in Jacq., *S. intricata* Lap., *S. pentadactylis* Lap. i *S. pubescens* Pourr.). I hem analitzat, a més, alguns híbrids naturals entre aquests tàxons, especialment *S. ×cadevallii* Luiz., descrita com a híbrid de *S. genesiana* i *S. vayredana*, que creix també al Montseny. La qüestió immediata que ens esperonà fou d'esbrinar la relació entre *S. genesiana* i *S. geranioides*, morfològicament molt properes, tal vegada vicariants (o potser convergents), i presumiblement sortides d'una mateixa estirp en temps no gaire llunyans. Per això ens hi referim amb més insistència i s'investigà la cita-

ció de *S. geranioides* al Puigsacalm (Villegas, 2002) com a possible pont entre els Pirineus i el Montseny. Les indicacions d'aquesta espècie als mapes d'ORCA i de Biocat (Font, 2013) i la seva inclusió al catàleg de la Garrotxa (Oliver & Font, 2008) responen, però, a una antiga citació de Vayreda (com a *S. geranioides* var. *ladanifera* Engl.) que s'ha de referir en realitat a *S. fragilis*.

Els aspectes que hem estudiat en aquest projecte són:

- a) morfologia detallada de l'aparell vegetatiu i de les flors
- b) mida, ornamentació i viabilitat dels grans de pol·len i de les llavors
- c) quantificació del DNA nuclear
- d) recomptes cromosòmics
- e) seqüenciació de regions del DNA nuclear i cloroplàstic
- f) anàlisi d'haplotips mitjançant la seqüenciació d'altres regions cloroplàstiques

En aquest treball ens centrem en els quatre primers aspectes. Els altres dos (juntament amb una part del tercer) són tractats en un article diferent (vegeu Mas de Xaxars *et al.*, 2014); aquí, si és del cas, en donem simplement notícia resumida o alguna referència concreta.

Material i mètodes

El material emprat per a aquest estudi es va obtenir bàsicament de poblacions naturals de *Saxifraga*. Inicialment vam estudiar 46 poblacions de nou tàxons. Vam recollir mostres completes de les plantes de cada població, algunes de les quals van ser estudiades en fresc, per fer les mesures pertinents i recollir-ne pol·len i llavors, i altres van servir per a preparar plecs d'herbari que foren determinats (d'entrada de manera provisional), i dipositats a l'herbari BCN, del Centre de Documentació de Biodiversitat Vegetal de la Universitat de Barcelona.

La relació i l'origen corresponents a les poblacions estudiades es troben a la taula 1.

Per mesurar la quantitat de DNA i per fer les seqüenciacions, vam recollir, de totes les poblacions (i d'un total de 265 individus), fulles fresques que vam conservar, algunes al frigorífic fins al moment —sempre ben proper a la data de recollecció— de la mesura que se'n va fer per citometria de flux, i algunes altres en gel de sílice fins al moment de la seqüenciació. Com que els resultats inicials de mida del genoma corresponents a *S. geranioides* d'Ulldeter eren un xic incoherents, vam dur a terme un segon mostratge que abastava tota l'àrea de la població i que incloïa una altra espècie (*S. pubescens* subsp. *pubescens*) i l'híbrid d'aquesta amb *S. geranioides* (*S. × bubaniana* Engl. & Irmsch.); i vam marcar els individus per tal d'assegurar la traçabilitat de les dades. També vam recollir-ne llavors, per tal de fer-les germinar en placa i obtenir puntes de rels per dur a terme els recomptes cromosòmics.

Pel que fa a la morfologia de detall, els nostres estudis afecten *S. geranioides* i els tres tàxons del sistema Montseny-Guilleries i se centren en les mides de les flors i en l'aparell

vegetatiu. Vam prendre diverses mesures florals de tres poblacions de *S. geranioides*, de cinc de *S. genesiana* i d'una de *S. vayredana*; i vam analitzar també les dimensions i la forma de les fulles. Per a cada població es mesuraren cinc individus, concretament cinc flors per individu.

Quant als grans de pol·len, per a l'estudi morfològic hem aplicat el micromètode qualitatiu d'acetòlisi d'Avetissian (1950); i n'hem comprovat la viabilitat mitjançant el mètode d'Alexander (1969). El nombre de poblacions i d'individus mesurats, així com les mitjanes dels diàmetres per tàxon, s'indiquen a la taula 3. El tractament i l'observació de la superfície del pol·len i les granes amb el microscopi electrònic de rastreig (MER) es va dur a terme en els Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona.

Per a la quantificació del DNA hem aplicat tècniques d'extracció (Doležel *et al.*, 1989) i d'anàlisi de fluorescència mitjançant citometria de flux, seguint el protocol descrit a Garnatje *et al.* (2004). Es mesuraren dues rèpliques de cadascun dels individus recollits. En relació amb els recomptes cromosòmics, ja ha estat documentat (Redondo & Horjales, 1989; Vargas & Nieto-Feliner, 1995) que en aquest gènere resulta difícil d'obtenir bones preparacions cromosòmiques. Les llavors es van desar a 4 °C (d'1 a 2 anys) fins al moment de posar-les a germinar en una cambra en placa de Petri amb paper humit. Les condicions del germinador han estat d'alternança claror/foscor cada 12 h, a una temperatura constant de 20 °C. Després de diversos intents infructuosos, les últimes proves que hem fet, seguint el mètode descrit a Wakabayashi & Ohba (1988), a partir d'arrels de llavors germinades en plaques de Petri, pretractades amb colquicina i fixades amb una barreja d'etanol absolut, àcid acètic glacial i cloroform, i després d'hidrólisi amb HCl a 60 °C durant 30 segons, han donat més bons resultats. Finalment s'obtingué, a part d'altres que permetien comptar els cromosomes, però no eren perfectes per a ser publicades, una bona placa metafàsica de la població de *S. genesiana* del Turó Gros i tres de la població de *S. geranioides* d'Ulldeter.

Resultats i discussió

Morfologia detallada

Pel que fa als paràmetres florals del grup *S. geranioides-genesiana-vayredana*, tot i que les mitjanes són significativament diferents, les distàncies entre *S. genesiana* i *S. geranioides* són petites i no permeten discriminar amb seguretat un tàxon de l'altre. Si que resulten evidents, però, les diferències entre aquestes dues i *S. vayredana*, com també les característiques intermèdies de *S. × cadevallii* respecte dels seus tàxons parentals en la majoria de mesures florals (Fig. 1).

Mentre que els valors de mida floral obtinguts per a *S. geranioides* i *S. vayredana* es corresponen amb els que signa *Flora iberica* (Vargas, 1997b), els que hem obtingut per a *S. genesiana* no coincideixen amb els de la descripció de l'espècie (Vargas, 1997a), sinó que són palesament més grans (vegeu la taula 2).

Taula 1. Origen del material estudiat.

Codi	Tàxon	Localitat, recol·lectors i data
Ssub1	<i>S. ×bubaniana</i>	Catalunya: Ripollès, Setcases, prop de l'aparcament sota el refugi d'Ulldeter, <i>Mas de Xaxars i Sánchez-Jiménez</i> , 21 juliol 2010
Scad1	<i>S. ×cadevallii</i>	Catalunya: les Guilleries, Sant Hilari Sacalm, vessant NE del Turó de Faig Verd, <i>Garnatje, Mercadé i Sánchez-Jiménez</i> , 2 juny 2010
Scad2	<i>S. ×cadevallii</i>	Catalunya: Montseny, vessant N del Matagalls, Coll Sabènia, <i>Barnola, Pié, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Scad4	<i>S. ×cadevallii</i>	Catalunya: Montseny, Turó Gros, <i>Barnola, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Scad5	<i>S. ×cadevallii</i>	Catalunya: Montseny, vessant N del Matagalls, Sot de les Cordes, <i>Barnola, Pié i Sánchez-Jiménez</i> , 14 juny 2010
Sfra1	<i>S. fragilis</i>	Catalunya: les Guilleries, Susqueda, Mare de Déu del Far, <i>Garnatje, Mercadé i Sánchez-Jiménez</i> , 2 juny 2010
Sfra2	<i>S. fragilis</i>	Catalunya: Vallès Occidental, cingles de Sant Sadurn de Gallifa, Serrat Punxegut, <i>Mercadé</i> , 1 juny 2010
Sfra3	<i>S. fragilis</i>	País Valencià: Ports de Morella, castell de Morella, <i>Pérez-Haase i Sánchez-Jiménez</i> , 12 juny 2010
Sfra4	<i>S. fragilis</i>	Aragó: embassament de San Juan de la Peña, a prop de la resclosa, <i>Garnatje, Vallès i Villar</i> , 15 juny 2010
Sfra5	<i>S. fragilis</i>	Aragó: Jaca, Peña de Oroel, parador d'Oroel, <i>Garnatje, Vallès i Villar</i> , 15 juny 2010
Sfra6	<i>S. fragilis</i>	Catalunya: muntanyes de Prades, vall de Castellfollit, <i>Vigo i Masalles</i> , 21 juny 2010
Sfra7	<i>S. fragilis</i>	Occitània: Aude, les Corberes, roques calcàries sobre Lo Caunilh, <i>Cauwet-Marc i Vallès</i> , 26 juny 2010
Sgen1	<i>S. genesiana</i>	Catalunya: les Guilleries, Sant Hilari Sacalm, vessant NE del Turó de Faig Verd, <i>Garnatje, Mercadé i Sánchez-Jiménez</i> , 2 juny 2010
Sgen2	<i>S. genesiana</i>	Catalunya: Montseny, vessant N del Matagalls, coll Sabènia, <i>Barnola, Pié, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Sgen3	<i>S. genesiana</i>	Catalunya: Montseny, Puig Sacarbassa, <i>Barnola, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Sgen4	<i>S. genesiana</i>	Catalunya: Montseny, Turó Gros, <i>Barnola, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Sgen5	<i>S. genesiana</i>	Catalunya: Montseny, vessant N del Matagalls, Sot de les Cordes, <i>Barnola, Pié i Sánchez-Jiménez</i> , 14 juny 2010
Sgen6	<i>S. genesiana</i>	Catalunya: les Guilleries, Osor, Sant Miquel de Solterra, <i>Pérez-Haase</i> , 4 juliol 2011
Sger1	<i>S. geranioides</i>	Catalunya: Ripollès, carretera de Setcases a Vallter-2000, camí del refugi, part inferior (Ulldeter), <i>Barnola</i> , 30 juny 2010
Sger2	<i>S. geranioides</i>	Andorra: Ordino, estany del Mig de Tristaina, <i>Carrillo i Ferré</i> , 8 juliol 2010
Sger3	<i>S. geranioides</i>	Andorra: Ordino, Estret de l'Estanyó, pujant a l'Estanyó, <i>Batriu, Mercadé i Pérez-Haase</i> , 8 juliol 2010
Sger4	<i>S. geranioides</i>	Andorra: Ordino, Estanyó, cap al cim, <i>Batriu, Mercadé i Pérez-Haase</i> , 8 juliol 2010
Sger5	<i>S. geranioides</i>	Catalunya: Alta Ribagorça, Estanyet (estany superior) de Besiberri, <i>Solé i Talavera</i> , 13 juliol 2010
Sger6	<i>S. geranioides</i>	Occitània: Arieja, Portella d'Orlu, <i>Blanco Moreno, Pérez-Haase i Petit</i> , 11 juliol 2010
Sger7	<i>S. geranioides</i>	Catalunya: Ripollès, coll de les Clotes del Puigmal, <i>Vigo, Barnola, Mercadé i Tenas</i> , 21 juliol 2010
Sint1	<i>S. intricata</i>	Aragó: Baños de Panticosa, <i>Garnatje, Vallès i Villar</i> , 15 juny 2010
Sint2	<i>S. intricata</i>	Catalunya: Vall d'Aran, Coth der Estanh, <i>Vallès, Vigo i Villar</i> , 6 juliol 2010
Sint3	<i>S. intricata</i>	Catalunya: Vall d'Aran, Mont Lude, <i>Villar</i> , 6 juliol 2010
Sint4	<i>S. intricata</i>	Catalunya: Vall d'Aran, Estanh Long de Vilamòs, <i>Vallès, Vigo i Villar</i> , 6 juliol 2010
Sjea1	<i>S. ×jeanpertii</i>	Catalunya: Ripollès, Núria, coma de les Molles, <i>Barnola i Vigo</i> , 30 juny 2010
Smos1	<i>S. moschata</i>	Catalunya: Ripollès, Pas dels Lladres, <i>Vigo, Barnola, Mercadé i Tenas</i> , 21 juliol 2010
Smos2	<i>S. moschata</i>	Catalunya: Ripollès, entre el coll de la Marrana i el cim de Bastiments, <i>Mas de Xaxars i Sánchez-Jiménez</i> , 21 juliol 2010
Smos3	<i>S. moschata</i>	Catalunya: Alta Ribagorça, tarteres vora l'Estany (inferior) de Besiberri, <i>Simon, Vallès, Espuña, Garcia, Jácome, Marimon, Quaglia, Rosique, Solé i Talavera</i> , 13 juliol 2010
Smos4	<i>S. moschata</i>	Aragó: Alta Ribagorça, roques vora el camí del coll d'Anglos des de l'embassament de Llauset, <i>Simon, Vallès, Espuña, Garcia, Jácome, Marimon, Quaglia, Rosique, Solé i Talavera</i> , 14 juliol 2010
Spen4	<i>S. pentadactylis</i>	Catalunya: Ripollès, cim de Bastiments, <i>Mas de Xaxars i Sánchez-Jiménez</i> , 21 juliol 2010
Spen2	<i>S. pentadactylis</i>	Andorra: Ordino, vora les instal·lacions d'esquí d'Arcalis, <i>Vallès i Vigo</i> , 8 juliol 2010
Spen3	<i>S. pentadactylis</i>	Andorra: Ordino, Estret de l'Estanyó, <i>Batriu, Mercadé i Pérez-Haase</i> , 8 juliol 2010
Spub1	<i>S. pubescens</i> subsp. <i>pubescens</i>	Catalunya: Ripollès, Núria, Creu d'en Riba, <i>Barnola</i> , 25 juny 2010
Spub2	<i>S. pubescens</i> subsp. <i>pubescens</i>	Catalunya: Ripollès, Setcases, prop de l'aparcament sota el refugi d'Ulldeter, <i>Barnola, Garnatje, Mas de Xaxars, Mercadé, Sánchez-Jiménez, Vallès i Vigo</i> , 29 juny 2011
Spub3	<i>S. pubescens</i> subsp. <i>pubescens</i>	Catalunya: Ripollès, Pas dels Lladres, <i>Vigo, Barnola, Mercadé i Tenas</i> , 21 juliol 2010
Spub4	<i>S. pubescens</i> subsp. <i>pubescens</i>	Catalunya: Ripollès, sobre el coll de les Clotes del Puigmal, <i>Vigo, Barnola, Mercadé i Tenas</i> , 21 juliol 2010
Svay1	<i>S. vayredana</i>	Catalunya: les Guilleries, Sant Hilari Sacalm, vessant NE del Turó de Faig Verd, <i>Garnatje, Mercadé i Sánchez-Jiménez</i> , 2 juny 2010
Svay2	<i>S. vayredana</i>	Catalunya: Montseny, vessant N del Matagalls, Coll Sabènia, <i>Barnola, Pié, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Svay3	<i>S. vayredana</i>	Catalunya: Montseny, Puig Sacarbassa, <i>Barnola, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Svay4	<i>S. vayredana</i>	Catalunya: Montseny, Turó Gros, <i>Barnola, Vallès i Vigo</i> , 10 juny 2010
Svay5	<i>S. vayredana</i>	Catalunya: Montseny, vessant N del Matagalls, Sot de les Cordes, <i>Barnola, Pié i Sánchez-Jiménez</i> , 14 juny 2010

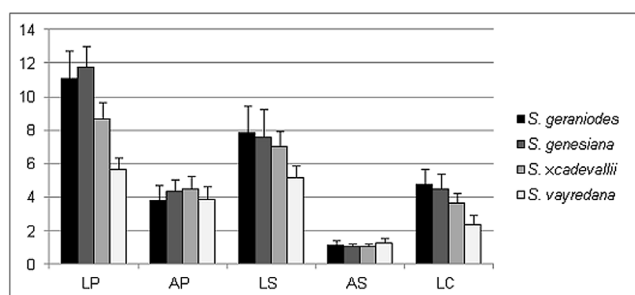


Figura 1. Mitjanes per tàxon (en mil·límetres) dels paràmetres florals mesurats, basades en la mitjana marginal poblacional modificada. LP: longitud dels pètals; AP: amplada dels pètals; LS: longitud de les dents dels sèpals; AS: amplada de les dents dels sèpals; LC: longitud del calze.

Taula 2. Mides (en mil·límetres) dels pètals i les llavors de *S. geranioides* (Sger) i *S. genesiana* (Sgen) segons diverses flores i segons els nostres resultats. Nota: la Flora dels Països Catalans (Bolòs & Vigo, 1984) considera ambdós tàxons (Sger i Sgen) com a *S. geranioides* i la Flora manual dels Països Catalans (Bolòs *et al.*, 2005) com a subespècies de *S. geranioides*. Vegeu la taula 1 per als codis dels tàxons.

	Pètals				Llavors			
	Llargada		Amplada		Llargada		Amplada	
	Sger	Sgen	Sger	Sgen	Sger	Sgen	Sger	Sgen
Flora iberica	(7)9-12(16)	(6)7-9(11)	(2)3-4(6)	2-3	0,60-0,80	0,55-0,65	0,35-0,45	0,35-0,45
Flora PC	(87)910-14(816)9		(2)3-4(6)		(sense dades)			
Flora manual PC	7-12(16)	3*-10(13)	(sense dades)	0,60-0,80	0,50-0,66	(sense dades)		
Dades de l'estudi	(7)9-13(14)	(8)10-13(14)	(2)3-4(6)	(3)4-5(6)	0,58-0,74	0,53-0,76	0,25-0,42	0,26-0,44

* Longitud mínima inversemblant, que si bé és la que consta a la Flora manual dels Països Catalans (Bolòs *et al.*, 2005), respon probablement a una errada d'impremta; hauria de ser un 6.

Malgrat que la mida de les peces florals sembla disminuir amb l'altitud, la correlació entre ambdues variables no es mostra significativa ($p > 0,05$).

Les dimensions i la forma de les fulles també mostren una variabilitat força notable dintre de cada tàxon (Fig. 2). Les de *S. vayredana* són clarament diferents de les altres i s'ajusten a les descripcions morfològiques usals (vegeu, per exemple, Bolòs & Vigo, 1984 o Vargas, 1997b); com també les de *S. ×cadevallii* (Luizet, 1931), que resulten clarament intermèdies entre les dels seus progenitors. Entre *S. geranioides* i *S. genesiana*, en canvi, no vam trobar diferències decisives, llevat que en aquesta darrera apareixen més sovint (sobretot en algun exemplar de les Guillerries i en un individu que es feia dins la fageda del Matagalls) fulles no tan profundament dividides i amb els lòbuls no tan aguts, un xic acostades a les que descriu i dibuixa l'autor del tàxon (Vargas, 1997a).

Sense especificar mesures concretes, vegeu una mostra representativa del fullatge d'aquests quatre tàxons en la figura 2. Les fulles representades són les homòlogues de cada tàxon (sempre de la roseta basal).

Cal dir que dues de les plàntules procedents de la germinació de llavors de *S. genesiana* mostraven inicialment una morfologia semblant a la de l'exemplar que havia obtingut Vargas (1997a) pel mateix procediment i que il·lustra la descripció de la nova espècie. Podia tractar-se d'una modificació induïda per les condicions de desenvolupament d'aquests individus? Per tal de comprovar-ho, a mitjan abril vam trasplantar els exemplars «anòmals» en una localitat monsignàtica sotmesa a un ambient natural estàndard, on vam sembrar-hi ensemes grans de la mateixa planta mare. Al cap de dos mesos i mig (a final de juny) els individus trasplantats havien produït fulles bon xic semblants a les dels individus espontanis (vegeu la figura 3).

Quant als grans de pol·len i les llavors, ens interessava sobretot discriminar entre *S. geranioides* i les estirps del Montseny (*S. genesiana* i *S. vayredana*, i el seu híbrid *S. ×cadevallii*).

Grans de pol·len

Pel que fa a les mesures dels grans de pol·len (Taula 3), hem trobat diferències significatives en el volum entre la ma-

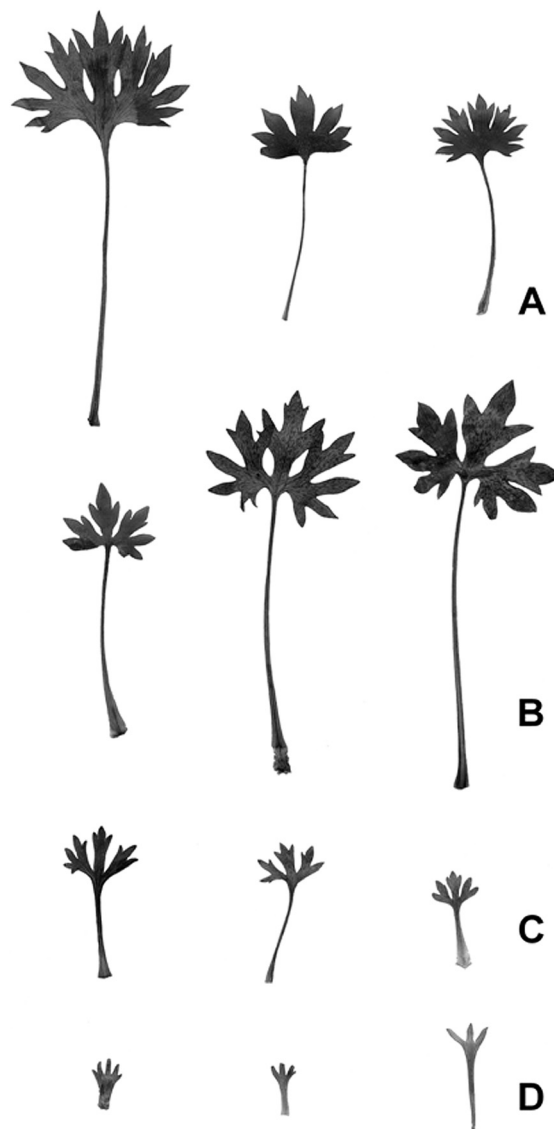


Figura 2. Fulles de *Saxifraga geranioides* (A), *S. genesiana* (B), *S. ×cadevallii* (C) i *S. vayredana* (D).

Taula 3. Mesures de pol·len per tàxon amb la seva desviació estàndard (SD). S'indica el nombre de poblacions estudiades i el nombre total de grans mesurades. D1 = Diàmetre polar; D2 = Diàmetre equatorial. Vol = Volum estimat. Vegeu la taula 1 per als codis dels tàxons.

Codi de tàxon	Nombre de poblacions	Nombre de grans	D1 (μm)	SD D1	D2 (μm)	SD D2	VOL (μm^3)	SD VOL
Scad	4	120	24,66	0,19	18,59	0,16	4553	102,8
Sfra	5	150	28,35	0,17	20,53	0,14	6497	92
Sgen	5	150	26,56	0,17	19,28	0,14	5371	92
Sger	6	210	26,09	0,15	19,29	0,12	5201	80,4
Sint	1	60	20,87	0,27	17,5	0,22	3412	145,5
Sjea	1	60	19,18	0,27	14,96	0,22	2292	145,5
Smos	3	90	23,52	0,22	19	0,18	4565	118,8
Smos4	1	60	26,21	0,27	20,07	0,22	5570	145,5
Spen	2	60	21,92	0,27	16,86	0,22	3419	145,5
Spub	3	90	25,28	0,22	18,38	0,18	4578	118,8
Svay	5	138	23,45	0,18	17,6	0,15	3987	97,9

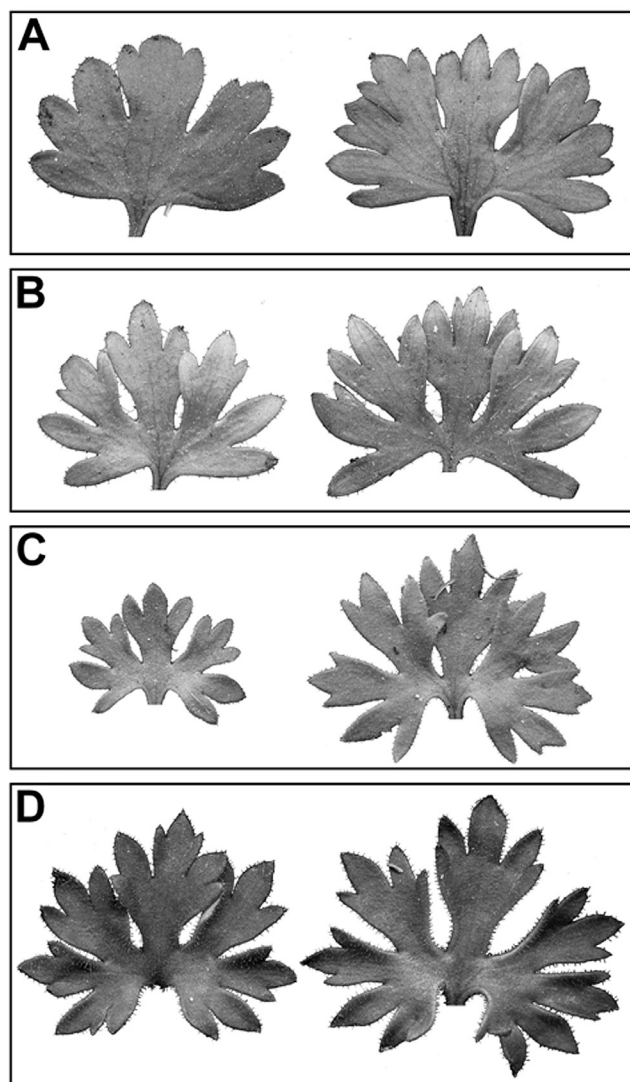


Figura 3. Fulles d'exemplars de *Saxifraga genesiana*. A i B: fulles (dues per individu) dels dos exemplars trasplantats al Turó Gros (Montseny) el 13 d'abril de 2012. C: fulles (una per individu) dels mateixos exemplars, recollides el 23 de juny de 2012. D: fulles d'un exemplar espontani, recollides al mateix indret el 13 d'abril de 2012.

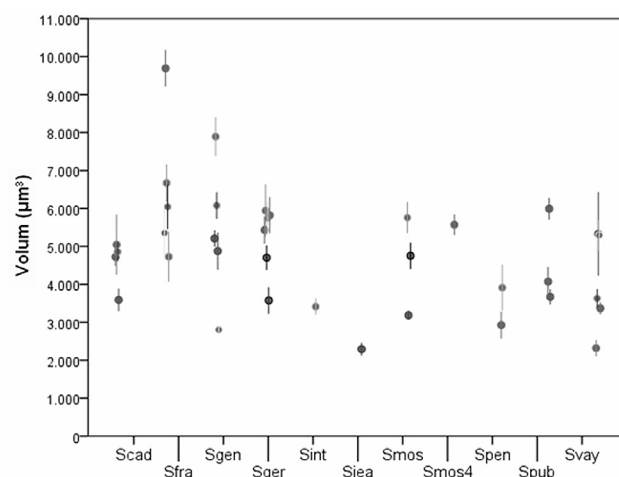


Figura 4. Volum estimat dels grans de pol·len en μm^3 per tàxon. Cada punt representa una mitjana poblacional amb les seves barres d'error (interval de confiança: 95 %). Vegeu la taula 1 per als codis dels tàxons.

joria d'aquests tàxons ($p = 0,000$). No obstant, la forta correlació positiva entre els dos diàmetres (polar i equatorial) en el conjunt dels grans de pol·len mesurats (coeficient de correlació d'Spearman = 0,656, $p = 0,000$) indica que, en general, es mantenen les proporcions. També s'ha detectat una gran variabilitat interpoblacional (Fig. 4), amb la qual cosa no seria possible assignar un gra de pol·len a un únic tàxon amb una elevada confiança només per les seves mesures. L'ornamentació de l'exina observada al microscopi electrònic de rastreig tampoc no dona cap tret distintiu (Fig. 5).

És remarcable, però, que el pol·len de totes les poblacions estudiades ha resultat altament viable (més del 90 %), fins i tot en el cas de l'híbrid esmentat i en els de poblacions híbrides entre altres tàxons mostrejades per nosaltres. A més, la morfometria pol·línica de *S. ×cavedallii* tampoc no dona indicis de l'origen híbrid d'aquest tàxon, ja que no hi apareixen grans de pol·len deformats (la qual cosa és lògica atesa l'elevada taxa de viabilitat que hem vist que tenien) i, a part d'això, no s'observa irregularitat ni bimodalitat en les mides dels grans, fets que sovint es donen en híbrids.

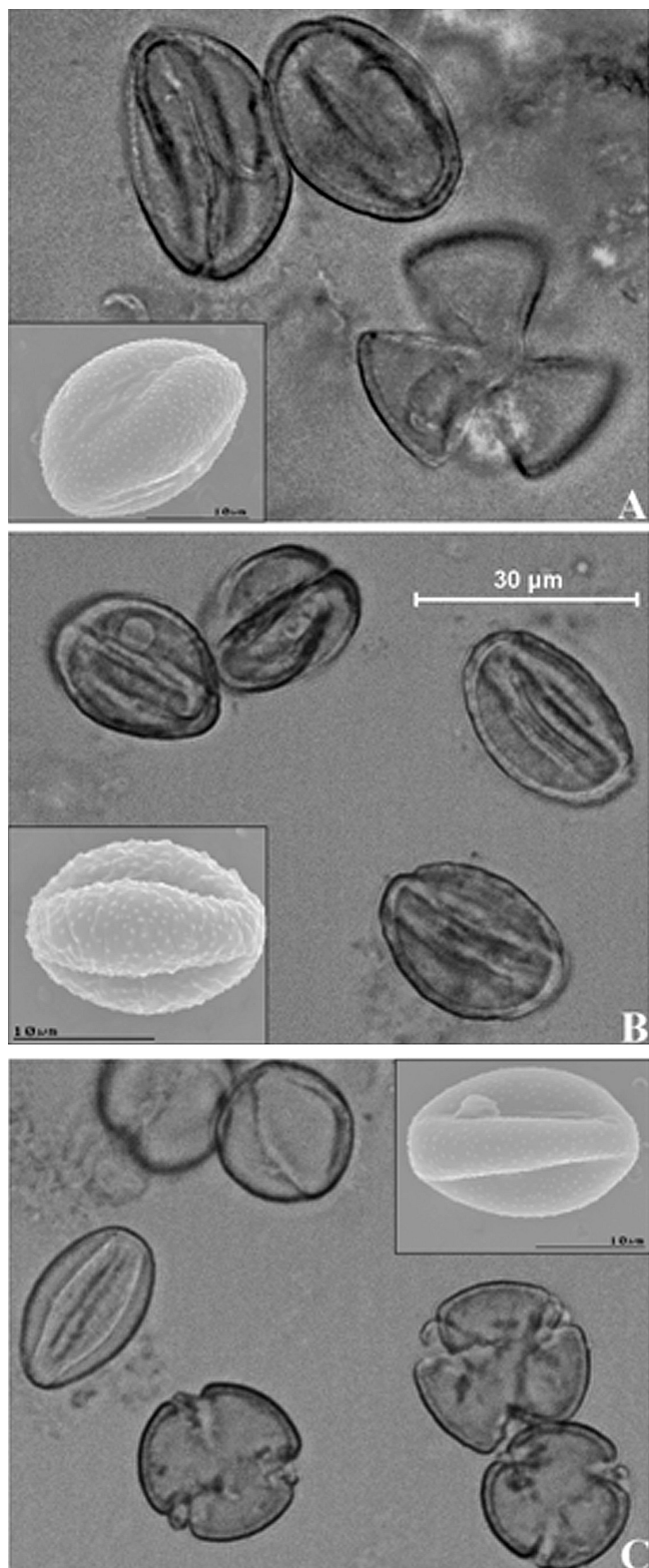


Figura 5. Fotografies de pol·len al microscopi òptic i al microscopi electrònic de rastreig (MER) de la localitat del Turó Grós; A: *S. genesiana*, B: *S. xcadvallii*, C: *S. vayredana*. L'escala és la mateixa per a les tres imatges del microscopi òptic.

Se sospitava de fa temps (Vargas, 1997a) que *S. xcadvallii* no es retroencruava amb cap dels seus progenitors i les quantitats de DNA ho han confirmat (vegeu el subapartat següent). Nosaltres hem comprovat també que *S. xcadvallii* és estèril per algun mecanisme postzigòtic —atès que el pol·len és fèrtil—, que faria que les llavors fossin, totes o la gran majoria, inviables (vegeu Mas de Xaxars *et al.*, 2014).

Llavors

Les mides de les llavors tampoc no són decisives en el cas de *S. geranioides* i *S. genesiana* (Taula 2). En canvi, hi ha una diferència ben neta en l'ornamentació secundària o microornamentació (Vargas, 1997a i aquest estudi), és a dir, el relleu que presenta l'episperma. Aquesta microornamentació comporta tres menes de papil·les. Hom troba: 1) micropapil·les, de longitud inferior a 10 µm i 2) macropapil·les, de longitud superior a 15 µm. Les macropapil·les se subdivideixen, al seu torn, en dos subtipus: a) les més llargues que amples, clarament diferenciades, i b) les més amples que llargues, no tan netament diferenciades (Fernández Areces *et al.*, 1988). En les llavors de *S. vayredana* s'hi barregen micropapil·les i macropapil·les de tipus a, *S. geranioides* presenta únicament micropapil·les, mentre que *S. genesiana* té micropapil·les barrejades amb macropapil·les del tipus b (Fig. 6).

Vista l'ornamentació tan diferent de les granes de *S. genesiana* i les de *S. vayredana*, resultava interessant d'observar l'ornamentació de l'híbrid *S. xcadvallii*. Vam comprovar, però, que no tenen ornamentació definible (Fig. 7), cosa que es trobà també en un altre tàxon híbrid (*S. xsomeana* Fern. Prieto & T.E. Díaz, Fernández Areces *et al.*, 1988). L'explicació és que les granes de l'híbrid no arriben a madurar (o, si algunes ho fan, nosaltres no les vam pas detectar).

La microornamentació és un caràcter important en el gènere *Saxifraga* (Kaplan, 1976), tal com queda reflectit en aquest cas. De totes maneres se sap que algunes espècies produeixen ensembles granes solament amb micropapil·les i granes amb ambdós tipus d'ornamentació, de vegades fins i tot dins d'una mateixa població (Fernández Areces *et al.*, 1988).

Assenyalarem que, en el procediment de germinació de les llavors previ als estudis cariològics, en el cas de *S. genesiana* van germinar-ne més del 60 %; per contra, granes d'una de les mateixes poblacions, després de passar un parell de dies al congelador, van donar solament un 13 % de germinació. En *S. geranioides*, la germinació va ser coincident, d'un 45 %, per a ambdós tractaments. En el cas de *S. vayredana*, la germinació ha estat molt baixa (19 %), probablement perquè la majoria de llavors no eren prou madures. De *S. xcadvallii*, no ha germinat cap llavor (vegeu comentaris anteriors sobre l'esterilitat d'aquest tàxon).

Quantificació del DNA nuclear

Els resultats complets d'aquesta anàlisi, concernents a tots els tàxons estudiats, poden ser consultats a Mas de Xaxars *et al.* (2014).

A la figura 8 presentem les dades corresponents solament a *S. geranioides* i *S. genesiana*. Els cinc individus mostre-

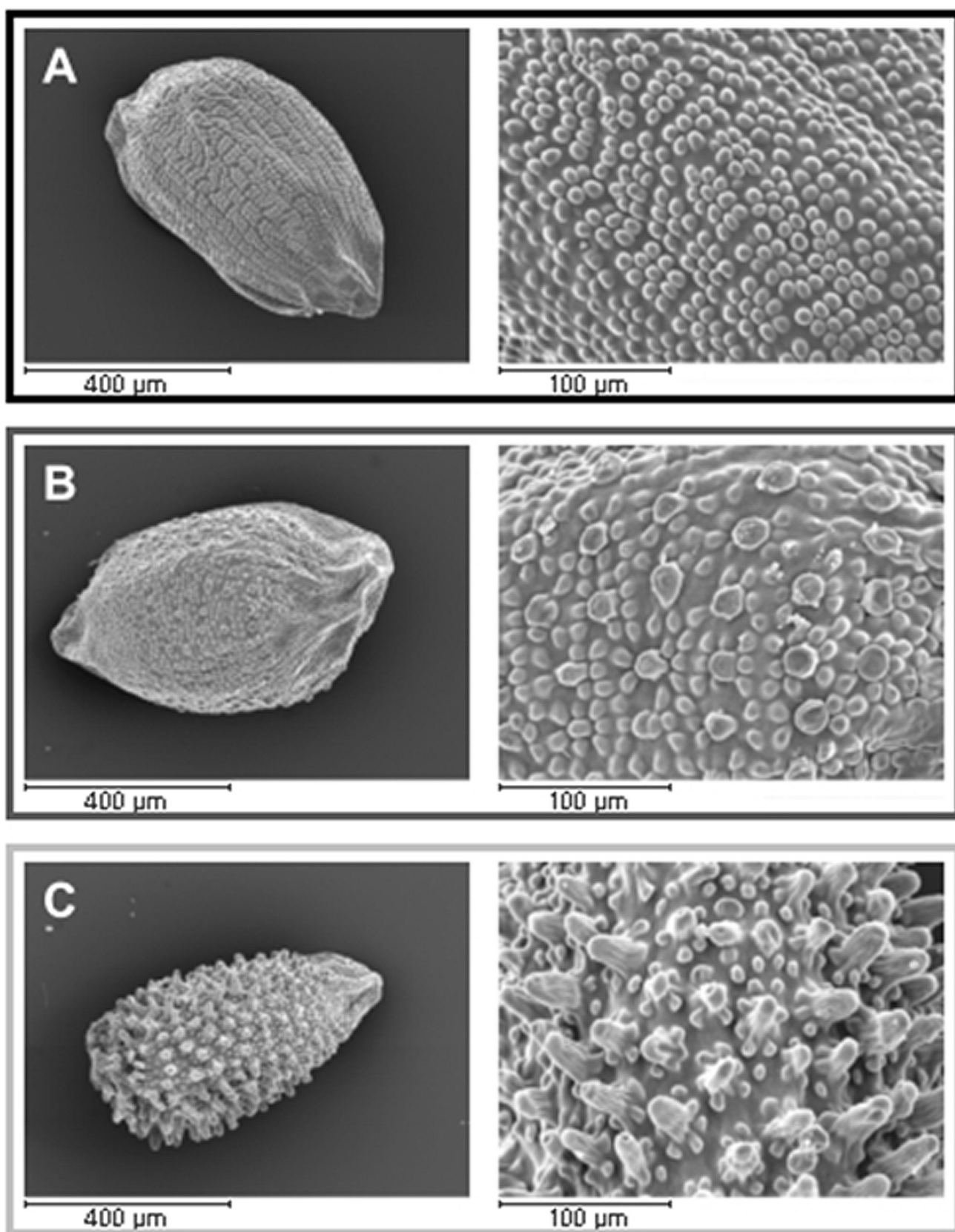


Figura 6. Microornamentació de les granes, observada al MER. A, *S. geranioides* d'Ulldeter. B, *S. genesiana* del Turó Gros. C, *S. vayredana* del Turó Gros.

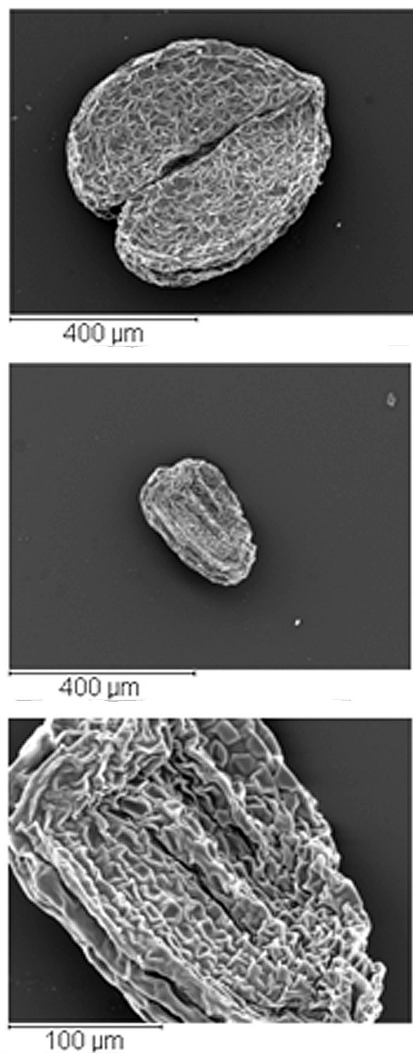


Figura 7. Microornamentació de les granes de *S. x cadevallii* de la localitat del Coll de Sabènia, a diferents augments al MER.

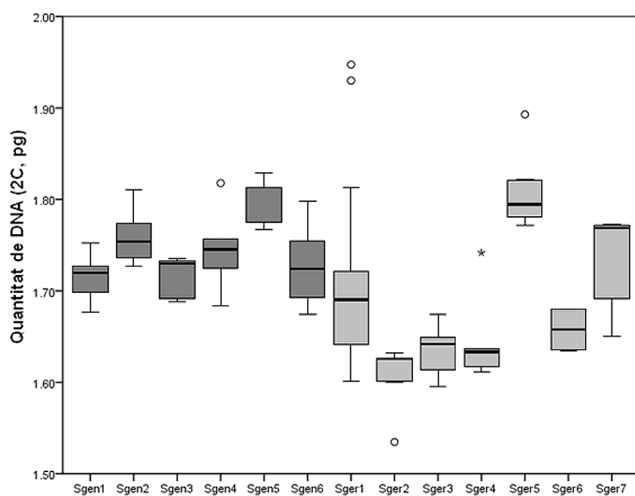


Figura 8. Valors de mida del genoma (2C, pg) amb desviació estàndard (barres d'error) per a poblacions de *Saxifraga genesiana* i *S. geranioides*. Els codis dels tàxons (en les abscisses) són idèntics als que figuren en la taula 1.

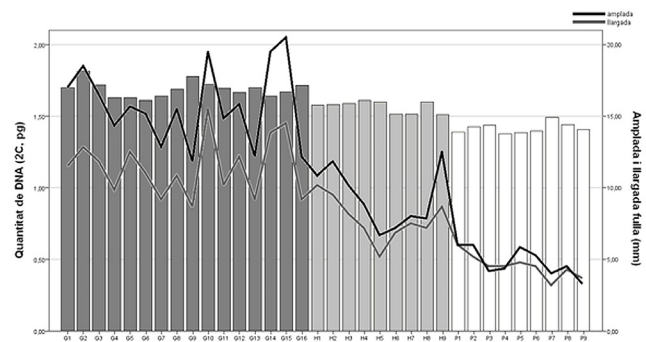


Figura 9. Valors de mida del genoma (2C, pg; barres) i d'amplada i llargada de les seves fulles (mitjana de tres fulles, en mm; línies) dels individus mostrejats a Ulldeter (G = *S. geranioides*, H = *S. x bubaniana*, P = *S. pubescens* subsp. *pubescens*).

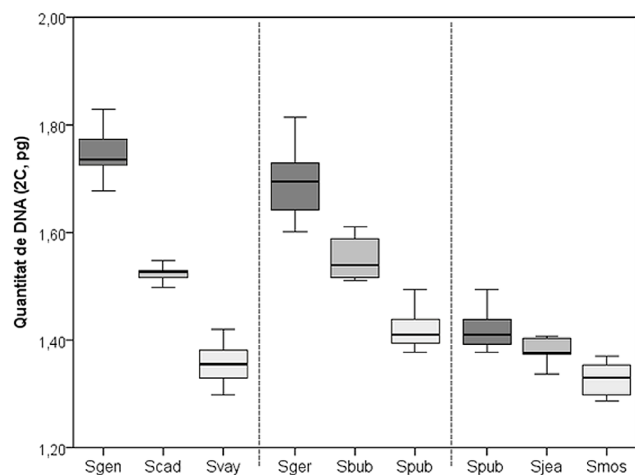


Figura 10. Relació entre les mides del genoma (2C, pg) dels tàxons híbrids trobats i les dels tàxons parentals corresponents. Vegeu la taula 1 per als codis dels tàxons.

jats inicialment a la població de *S. geranioides* d'Ulldeter (Sger1) donaren uns valors de 2C anormalment elevats, en especial pel que fa a un individu amb 2,46 pg (un increment de quantitat al voltant del 50 % respecte a la mitjana de l'espècie). A la vista d'aquests resultats vam decidir d'iniciar un estudi exhaustiu de les poblacions que conviuen en la localitat d'Ulldeter (*S. geranioides*, *S. pubescens* subsp. *pubescens* i el seu híbrid *S. x bubaniana*), seguint el procediment explicat en l'apartat de material i mètodes. Vam trobar, novament, força variabilitat en la quantitat de DNA nuclear, però els valors detectats no foren en cap cas tan elevats com els obtinguts amb el material de la primera recollecció. Aquests es mostren a la figura 9, juntament amb les mesures mitjanes d'amplada i llargada de les fulles dels espècimens.

Pel que fa a *S. geranioides*, traient els casos extrems (vegeu la figura 8), la resta dels valors obtinguts foren idèntics als de les poblacions andorranes (Sger2, 3 i 4) i als de l'occitana d'Orlú (departament de l'Arieja) (Sger6). Això podria fer pensar que la població d'Ulldeter enclou una gran diversitat i que deuria representar el nucli diversificador o refugi del tàxon (Gómez & Lund, 2004). D'altra banda, l'estudi dels

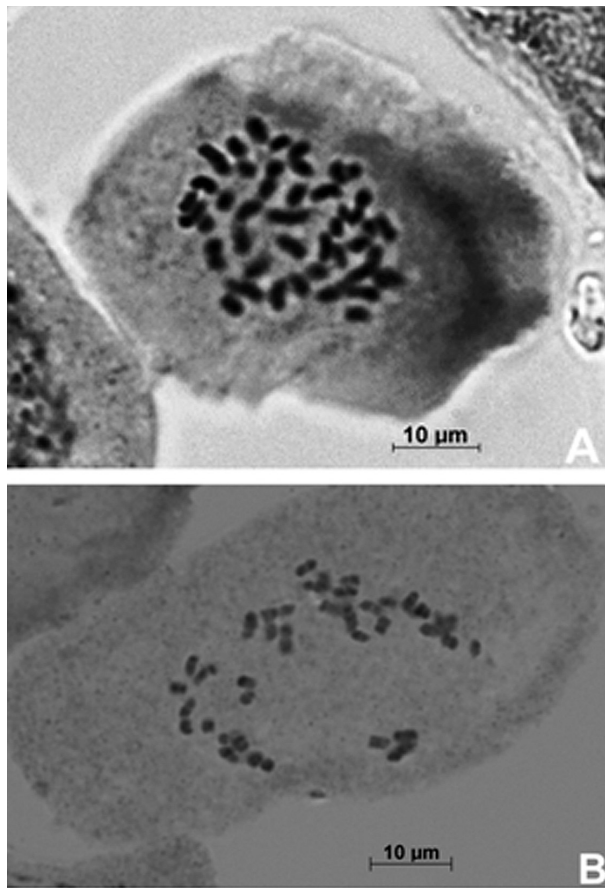


Figura 11. Metafases mitòtiques de *S. genesiana* Turó Gros (A) i *S. geranioides* Ulldeter (B).

haplotips, que aquí no mostrem, ens fa sospitar que la població del Puigmal (Sger7), podria ser la que va colonitzar el Montseny, atesos també la seva proximitat geogràfica i el seu similar contingut de DNA (vegeu figura 8 i Mas de Xaxars *et al.*, 2014).

De manera més general, les quantitats de DNA han estat útils per a confirmar la condició híbrida (Garcia *et al.*, 2008) de les poblacions de què ja sospitàvem aquest origen per mitjà de l'estudi morfològic. Ho hem comprovat per a *S. ×cadevallii* del Montseny (*S. genesiana* × *S. vayredana*), per a *S. ×jeanpertii* Luiz. (*S. moschata* × *S. pubescens* subsp. *pubescens*) de Núria (Sjea1) i per a *S. ×bubaniana* (*S. geranioides* × *S. pubescens* subsp. *pubescens*) d'Ulldeter (Sbub1). En tots aquests casos la quantitat de DNA dels individus híbrids correspon a aproximadament la mitjana entre la de les espècies parentals (Fig. 10), la qual cosa permet, a més, descartar esdeveniments d'introgressió o retroencreuament, ja que si se n'hagués donat trobaríem un ventall de quantitats de DNA en comptes de la mitjana.

A banda d'implicacions sistemàtiques teòriques, assenyalem que hem trobat una correlació positiva (coeficient de correlació d'Spearman = 0,496, $p=0,001$) entre el volum del gra de pol·len i la quantitat de DNA. Aquest fet ja havia estat reportat en nombrosos casos, bé que no sembla generalitzable per a totes les plantes (Knight *et al.*, 2010 i referències que conté). Darrerament, una de les autores d'aquest treball

ha detectat també aquest fenomen en tàxons del gènere *Echinops* L. (*Asteraceae*) (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2012).

Recomptes cromosòmics

Tant per a *S. genesiana* com per a *S. geranioides* hem comptat un nombre de cromosomes proper a $2n=44$ (Fig. 11). Tot i haver utilitzat en cada cas diversos individus i diverses plaques metafàsiques de cadascun, donem el nombre aproximat, perquè creiem que la difícil morfologia cromosòmica de *Saxifraga* en dificulta l'assignació exacta si hom no vol exposar-se a pecar d'imprudent. Per exemple Dalgaard (1991), atribueix $2n = 124$ cromosomes a *Saxifraga maderensis* L. i ben segur que el nombre exacte pot ser aquest, però la figura que aquest treball dona també podria fer-ne dir un altre de proper. Per a les plantes que ens ocupen ara, Vargas (1994) afirma que va intentar un recompte en meiosi de *S. geranioides* i en dona un resultat d' $n = 28$ que qualifica d'imprecís i que marca amb un interrogant, en la línia de prudència que abans esmentàvem. Aquest recompte donaria suport a un de previ de $2n = 52$ (vegeu Vargas, 1994). De *S. genesiana*, Vargas esmenta $2n = 44$ sense donar-ne precisions. Les quantitats de DNA nuclear dels dos tàxons ($2C = 1,75$ pg en *S. genesiana* i $2C = 1,70$ pg en *S. geranioides*; Mas de Xaxars *et al.*, 2014), pràcticament idèntiques, reforcen la nostra hipòtesi que el nombre cromosòmic sigui el mateix en totes dues espècies, ja que una diferència de vuit cromosomes, per petits que siguin, s'hauria de reflectir en una variació significativa d'aquest paràmetre.

Diferenciació entre *S. geranioides* i *S. genesiana*

Per llur morfologia general aquests dos tàxons són molt semblants entre ells, de manera que no és pas estrany que els botànics clàssics no els separessin ni a nivell subespecífic.

La descripció inicial de *S. genesiana* devia basar-se en gran part en l'exemplar obtingut per sembra fora del seu ambient natural, i per això no s'adiu gaire amb les característiques normals dels exemplars silvestres (a un dels quals correspon, però, el tipus nomenclatural). De totes maneres, el tàxon del Montseny se separa bé de *S. geranioides* per l'ornamentació de les granes (Fig. 6). En canvi, els caràcters foliars no són clarament discriminatòris, i els florals, en contra del que diu la descripció original (Vargas, 1997a) i la majoria de diagnòstics (per exemple Bolòs *et al.*, 2005, Sàez *et al.*, 2010), no tenen gens de consistència per a diferenciar aquests dos tàxons. Les fotografies i el dibuix de *S. genesiana* que figuren al *Llibre vermell* (Sàez *et al.*, 2010, p. 264 i 265) són ben representatius al respecte i avalen els comentaris precedents (tot i que hi manca informació sobre les granes).

A banda dels caràcters de les llavors, també són diferents les condicions ambientals en què es troba un i altre tàxon. Tots dos es fan en terreny silici i preferentment en llocs tarterosos ombrívols i de blocs poc mòbils. *Saxifraga geranioides* ocupa, als Pirineus, un interval d'altitud que va d'uns 1600 a 3000 m, però rarament abunda per davall de 2000 m. Sovint colonitza tarteres o caos de blocs i de vegades apareix dins els neretars dels vessants pedregosos. *Saxifraga genesiana*,

exclusiva del sistema Montseny-Guilleries, ateny els cims més elevats (1650 m) i s'estén de manera molt general fins a uns 1400 m, bé que pot descendir molt més (fins a 1200 m i àdhuc a 800 m). Es fa a les tarteres en vies de fixació, però també s'enfila pels esqueis del rocam o apareix dins els matollars de ginebró i a les clarianes de l'ayetosa.

Pel que fa al tractament taxonòmic de *S. genesiana*, diversos botànics posteriors a l'autor del nom han seguit el seu criteri i l'han considerada també com a espècie independent. En canvi Bolòs *et al.* (2005) la combinen com a subespècie de *S. geranioides*, malgrat que, com acabem de dir, li atribueixen caràcters foliars i florals equivocats. Cal tenir en compte que les categories taxonòmiques no han estat mai definides de manera inequívoca i excloent, i és difícil que ho siguin en un temps proper. A la pràctica, cada botànic, a partir de les dades (morfològiques, genètiques, biològiques, ecogeogràfiques...) concernents a cada població vegetal adopta el criteri taxonòmic que li sembla més adient. Se sol dir que la taxonomia és l'art de trobar diferències; la valoració i categorització d'aquestes diferències, sovint lligada a interpretacions genètiques i evolutives, ve després de l'anàlisi inicial i és una decisió personal rarament indiscutible.

Conclusions

L'anàlisi de la quantitat de DNA discrimina força bé els diferents tàxons estudiats, i mostra que dintre de *S. geranioides* es donen diferències interpoblacionals significatives. D'altra banda, el fet que la població d'Ulldeter enclogui una gran diversitat interna suggereix que en aquesta àrea podria trobar-se el nucli diversificador del tàxon.

La quantitat de DNA s'ha mostrat com a bon predictor d'hibridació, car en els híbrids estudiats correspon netament a la mitjana entre les de les espècies parentals. Ho hem comprovat en els casos de *S. genesiana* × *S. vayredana* (*S. × cadevallii*) del Montseny, *S. moschata* × *S. pubescens* subsp. *pubescens* (*S. × jeanpertii*) de Núria i *S. geranioides* × *S. pubescens* subsp. *pubescens* (*S. × bubaniana*) d'Ulldeter.

S. × cadevallii produeix pol·len viable, però no hi ha indicis de retroencruament entre aquest híbrid i les espècies parentals. D'altra banda, les seves llavors no semblen arribar mai a madurar, és a dir, que aquest híbrid és estèril.

Saxifraga genesiana i *S. geranioides* s. str., que són morfològicament molt properes i deuen ser-ho també genèticament, se separen entre elles sobretot per l'ornamentació de les llavors.

Agraïments

Aquest estudi s'ha beneficiat d'un ajut a la recerca, concedit per la Secció de Ciències Biològiques de l'Institut d'Estudis Catalans; i d'una beca predoctoral de docència i recerca de la Universitat de Barcelona atorgada a un dels autors (G. M. de X.). Hem d'agrair a l'especialista del gènere *Saxifraga* Pablo Vargas, del Real Jardín Botánico de Madrid, les informacions donades i els comentaris que sobre aquest tre-

ball ens ha fet. D'altra banda, també agraïm la col·laboració de diversos col·legues i estudiants que, en nombre de dinou, participaren en les recerques de camp i en les recollides de material; no es deuran pas sentir menystinguts si no en repetim aquí llurs cognoms, que figuren en la columna tercera de la taula 1.

Bibliografia

- ALEXANDER, M. P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Biotechnic & Histochemistry*, 44 (3): 117-122.
- AVETISSIAN, E. M. 1950. Simplified method of pollen preparation by acetolysis. *Zhurnal Russkogo Botanicheskogo Obshchestva pri Akademii Nauk*, 35 (385): 6-7.
- BOLÒS, O. de & VIGO, J. 1984. *Flora dels Països Catalans*. Barcino, Barcelona. 2636 p.
- BOLÒS, O. de, VIGO, J., MASALLES, R. M. & NINOT, J. M. 2005. *Flora manual dels Països Catalans*. (3a edició). Pòrtic. Barcelona. 1310 p.
- DALGAARD, W. 1991. Chromosome studies in flowering plants from Macaronesia, II. *Willdenowia*, 20: 139-152.
- DOLEŽEL, J., BINAROVÁ, P. & LUCRETTI, S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 31 (2): 113-120.
- FERNÁNDEZ ARECES, M. P., DÍAZ, T. E., LLAMAS, F., VALENCIA, R. M., FERNÁNDEZ, D., FOMBELLA, M. A. & PÉREZ CARRO, J. 1988. Morfología de las semillas de algunos taxones del género *Saxifraga* L. (Sect. *Dactyloides* Tausch.). *Lagascalia*, 15 (extra): 263-274.
- FONT, X. 2013. Mòdul Flora i Vegetació. Banc de Dades de Biodiversitat de Catalunya. Generalitat de Catalunya i Universitat de Barcelona. Disponible en: <http://biodiver.bio.ub.es/biocat/homepage.html> [Data de consulta: 5 juny 2012].
- GARCIA, S., CANELA, M. Á., GARNATJE, T., MCARTHUR, E. D., PELLICER, J., SANDERSON, S. C. & VALLÈS, J. 2008. Evolutionary and ecological implications of genome size in the North American endemic sagebrushes and allies (*Artemisia*, Asteraceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 94: 631-649.
- GARNATJE, T., VALLÈS, J., GARCIA, S., HIDALGO, O., SANZ, M., CANELA, M. Á. & SILJAK-YAKOVLEV, S. 2004. Genome size in *Echinops* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae): karyological, ecological and phylogenetic implications. *Biology of the Cell*, 96 (2): 117-124.
- GOMEZ, A. & LUND, D. H. 2004. *Refugia within refugia: patterns of phylogeography concordance in the Iberian Peninsula*. P. 155-188. In: Weiss, S.; Ferrand, N. (eds.). *Phylogeography of southern European refugia*. Springer. Amsterdam. Netherlands. 377 p.
- KAPLAN, K. 1976. Zur embryologie und systematik der gattung *Saxifraga*. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 97: 61-71.
- KNIGHT, C. A., CLANCY, R. B., GÖTZENBERGER, L., DANN, L. & BEAULIEU, J. L. 2010. On the relationship between genome size and pollen size. *Journal of Botany*, vol. 2010, article ID 612017, 7 p.
- LUIZET, M. D. 1931. *Monographie des hybrides de Saxifrages Dactyles dits Dactyloides* P. 1-313 In: Guétrot, M. (ed.). *Plantes Hybrides de France Vol. 5-7*. Impr. Louis Jean. Gap. France. 313 p.
- MAS DE XAXARS, G., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A., BARNOLA, P., MARTÍN, J., MERCADÉ, A., VALLÈS, J., VARGAS, P., VIGO, J. & GARNATJE, T. 2014. Phylogenetic and

- cytogenetic studies reveal hybrid speciation in *Saxifraga* subsect. *Triplinervium* (Saxifragaceae). *Journal of Systematics and Evolution*. DOI: 10.1111/jse.12105
- OLIVER, X. & FONT, J. 2008. Catàleg de flora vascular de la Garrotxa. Institució Catalana d'Història Natural, Delegació de la Garrotxa. Olot. 165 p.
- REDONDO, N. & HORJALES, M. 1989. Datos cariológicos del género *Saxifraga* L. en el NW Ibérico. *Boletim da Sociedade Broteriana*, 62 (sér. 2): 195-203.
- SÀEZ, L., AYMERICH, P. & BLANCHÉ, C. 2010. *Llibre vermell de les plantes vasculars endèmiques i amenaçades de Catalunya*. Argania. Barcelona. 811 p.
- SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, I., HIDALGO, O., CANELA, M. Á., SILJAK-YAKOVLEV, S., SOLIĆ, M. E., VALLÈS, J. & GARNATJE, T. 2012. Genome size and chromosome numbers of *Echinops* (Asteraceae, Cardueae) in the Aegean and Balkan regions: technical aspects of nuclear DNA amount assessment and genome evolution in a phylogenetic frame. *Plant Systematics and Evolution*, 298 (6): 1085-1099.
- VARGAS, P. 1994. Estudios biosistemáticos en el género *Saxifraga*: serie *Ceratophyllae* (s.l.). Tesis doctoral. Universidad Complutense. Madrid. Espanya.
- VARGAS, P. 1997a. Otra especie del género *Saxifraga* L. (*Saxifragaceae*) endémica del macizo del Montseny (Cataluña). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 55: 191-195.
- VARGAS, P. 1997b. *Saxifraga* L. P. 162-242. In: Castroviejo, S.; Lainz, M.; López González, C.; Montserrat, P.; Muñoz Garmendia, F.; Paiva, J.; Villar, L. (eds.). *Flora iberica*. Vol. 5. Real Jardín Botánico, C.S.I.C. Madrid. Espanya. 320 p.
- VARGAS, P. & NIETO-FELINER, G. 1995. Cytotaxonomical study of *Saxifraga* series *Ceratophyllae* s.l. (*Saxifragaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 197: 209-223.
- VILLEGAS & ALBA, N. 2002. Plantas vasculars del Quadrat UTM 31T DG46. Vidrà. *ORCA. Catàlegs Florístics Locals*, 14. Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques. Barcelona. Espanya.
- WAKABAYASHI, M. & OHBA, H. 1988. *Cytotaxonomic study of the Himalayan Saxifraga*. P. 71-90. In: Ohba, H.; S. B. Malla, S.B. (eds.). *The Himalayan Plants*. Vol. 1. University of Tokyo Press. Tokyo. Japan. 386 p.