

ESTUDIO GENÉTICO COMPARATIVO DE LAS POBLACIONES DE *SILENE CILIATA* POURR. (CARYOPHYLLACEAE) COMO HERRAMIENTA PARA ESTUDIAR EL CAMBIO GLOBAL

Alfredo GARCÍA-FERNÁNDEZ¹

RESUMEN.— El cambio global es una de las principales amenazas para la biodiversidad a nivel mundial, pero una oportunidad para el estudio de los mecanismos de evolución y adaptación de los organismos ante los cambios. La alta montaña mediterránea, como son los Pirineos, se encuentra entre los ecosistemas más amenazados y su estudio debe ser prioritario debido a la gran cantidad de especies amenazadas y endémicas que alberga. Muchos de estos organismos ya han sobrevivido a cambios climáticos pasados, por lo que su estudio puede arrojar luz sobre el comportamiento futuro de las especies y los mecanismos que desarrollen para adaptarse y evolucionar. Los resultados confirman la existencia de haplotipos únicos y el gran interés en la conservación y la evolución de las poblaciones de *Silene ciliata* en los Pirineos de Huesca.

ABSTRACT.— The Global change is the most important threat to global biodiversity, but an excellent opportunity for researchers to study the mechanisms of evolution and adaptation of the organisms to changing environments. High Mediterranean mountains (e. g. the Pyrenees) are among the most threatened ecosystems, and their study must be prioritized due to the large number of threatened and endemic species that inhabit these mountains. Many of these organisms have survived to past climate changes, so their study may clarify the behavior and the processes developed by the species

Recepción del original: 5-2-2016

¹ Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología. Universidad Rey Juan Carlos. C/ Tulipán, s/n. E-28933 MÓSTOLES. alfredo.garcia@urjc.es

to adapt and evolve. In this study, we proposed the use of plastid DNA markers with the species *Silene ciliata*, an alpine survivor of several glacial-interglacial processes. The results confirm the existence of unique haplotypes and the great interest of the conservation and evolution of *Silene ciliata* populations from the Huesca Pyrenees.

KEY WORDS.— Global change, mountains, *Silene ciliata*, plastid DNA, Huesca Pyrenees.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Sin lugar a dudas, el cambio global es una de las principales preocupaciones de la sociedad y de la comunidad científica. Entendemos por cambio global el conjunto de acciones y procesos que están modificando los ecosistemas y las condiciones del planeta. Entre ellos podemos incluir los cambios del uso del suelo, la polución, el aumento de especies invasoras, pero, sobre todo, el cambio climático (MEA, 2005). La Tierra ha experimentado otras alteraciones climáticas de igual o mayor magnitud en el pasado, si bien este parece ser uno de los procesos más rápidos y el único en el que la actividad humana ha actuado como precursor (entre otros posibles agentes) de dichos cambios (DUARTE, 2006). Hasta la fecha, los impactos sociales y económicos que se generan como consecuencia del cambio global son incalculables, aunque sus consecuencias ya se notan en la vida diaria de las personas (por ejemplo, disminución en las precipitaciones de nieve en las zonas alpinas, aumento de los eventos climáticos extremos como sequías e incendios, presencia de especies invasoras que afectan a los cultivos, etcétera).

Sin embargo, para los científicos, este escenario de cambio global supone una oportunidad única para estudiar el comportamiento de las especies, las alteraciones de los ecosistemas y los cambios que se están produciendo (por ejemplo, existen trabajos desde la década de los sesenta que ya se centran en el estudio del cambio del clima, HARE, 1964) y se han propuesto numerosas estrategias para evaluar su impacto en los diferentes ecosistemas y comunidades. Desde un primer momento, se han elaborado todo tipo de modelos predictivos que intentan estimar (con más o menos acierto) el cambio en las principales variables climáticas (principalmente precipitación y temperatura) y el impacto que conllevaría en los distintos ecosistemas (se pueden consultar en cualquiera de los informes del Panel Intergubernamental de Expertos del Cambio Climático de la ONU, IPCC, 2013).

Tomando como base estos modelos, se han elaborado multitud de estudios posteriores, para alertar sobre las amenazas que se ciernen sobre todo tipo de especies, que verán reducido su hábitat potencial y podrán verse afectadas por el aumento de la distribución potencial de otras especies más competitivas (por señalar alguno de los ejemplos, GARCÍA-VALDÉS y cols., 2015; THULLER y cols., 2008; THULLER y cols., 2005). De manera simultánea y asociada, otros estudios han comparado las diferentes respuestas que se están desarrollando en todo tipo de organismos para hacer frente a todos estos cambios, e intentar luchar contra su desaparición (PARMESAN, 2006; SKELLY y cols., 2007; WALTHER, 2010). Las tres reacciones principales más estudiadas en los organismos las podemos englobar en migración (desplazamiento hacia hábitats más adecuados), plasticidad fenotípica (capacidad de generar cambios en un organismo ante una señal ambiental) y adaptación local (respuestas específicas a condiciones locales) a las nuevas condiciones ambientales (ENGLER y cols., 2011; JUMP y PEÑUELAS, 2005). Ninguna de ellas parece más adecuada que las otras y cada especie (o incluso cada población) puede adoptarlas en distintos momentos o de manera combinada.

Frente a esta gran inversión de recursos, talento y esfuerzos que se dedican a diagnosticar el impacto del cambio climático y sus consecuencias en las especies, todavía no se han planteado medidas o acciones concretas para intentar reducir los impactos del cambio climático en las poblaciones naturales de especies, o, sencillamente, favorecer la generación de algunas respuestas que les ayuden a superar las alteraciones que les ocasione el cambio global. Aunque se han elaborado algunos trabajos teóricos o en ambientes controlados (tipo mesocosmos, BELL y GONZÁLEZ, 2009; BERGMANN y cols., 2010; DOBLAS-MIRANDA y cols., 2015; HUFBAUER y cols., 2015), los trabajos en condiciones naturales de campo son inexistentes hasta la fecha.

Sin embargo, desde una visión más conservacionista, y frente a todo tipo de amenazas (no únicamente el cambio global), se han venido realizando actuaciones similares a la hora de intentar recuperar especies / poblaciones que se encontraban en grave riesgo de extinción, de las cuales pueden extraerse algunas importantes conclusiones. Las acciones que se han planteado han tenido como objetivo aumentar los tamaños poblacionales (rescate demográfico, HUFBAUER y cols., 2015), realizar las modificaciones necesarias en los espacios protegidos para albergar el mayor número de



Fig. 1. Ejemplar de *Silene ciliata* en flor en el Mirador de la Reina (Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido, Torla).

especies posible cuando las condiciones ambientales cambien (LANGDON y LAWLER, 2015; WIENS y cols., 2011), mejorar las condiciones genéticas (diversidad alélica, reducción de la endogamia, etcétera) de las especies o poblaciones más amenazadas (conocido como *rescate genético*, GARGANO y cols., 2015; WHITELEY y cols., 2015) o favorecer los procesos evolutivos hacia la adaptación de las nuevas condiciones (llamado *rescate evolutivo*, HOFFMANN y SGRO, 2011).

Ante todo esto, cobra especial relevancia estudiar especies que hayan subsistido a anteriores cambios climáticos y se hayan podido adaptar y sobrevivir a cambios similares a los que ahora nos enfrentamos. Entendiendo los mecanismos que han gobernado la supervivencia y adaptación de estas especies podremos elaborar estrategias o acciones para favorecer la conservación y la evolución de las especies amenazadas por el cambio global. Por todo ello, el estudio de especies como *Silene ciliata* Pourr. (Caryophyllaceae), que han sobrevivido a varias épocas glaciales

e interglaciares, cobra especial relevancia. *Silene ciliata* es una pequeña planta perenne endémica de Europa que habita en sistemas montañosos mediterráneos, desde la mitad norte de la península ibérica, pasando por el Macizo Central en Francia y los Apeninos en Italia, hasta la península balcánica (TUTIN y cols., 1995). En la península ibérica se encuentra en áreas montañosas por encima de los 1100 metros (Sistema Central, Sistema Ibérico, Cordillera Cantábrica y Pirineos). Habitualmente forma rosetas pulvulares que, aunque presentan gran variabilidad en cuanto al tamaño, pueden llegar a alcanzar los 2 centímetros de altura y los 15 centímetros de diámetro (fig. 1). En poblaciones naturales, *Silene ciliata* presenta niveles de ploidía muy variables (TUTIN y cols., 1995).

La enorme diversidad fenotípica de la especie puede deberse a esta gran variabilidad en el número de cromosomas, ya que se han descrito desde individuos diploides con 24 cromosomas (GARCÍA-FERNÁNDEZ y cols., 2012a) hasta poliploides que tienen más de un centenar ($2n = 192$, BLACKBURN, 1933).

Nuestra experiencia con *Silene ciliata* es prolongada en el tiempo y nos ha permitido elaborar numerosos trabajos bajo diversas perspectivas (por citar algunos ejemplos de nuestros trabajos: GARCÍA-FERNÁNDEZ, 2011; GIMÉNEZ-BENAVIDES y cols., 2005; LARA-ROMERO y cols., 2014). En nuestro último abordaje, KYRKOU y cols. (2015) elaboramos un estudio biogeográfico de la especie que resaltó la importancia de los Pirineos como un reservorio genético único, debido a la complicada historia de las montañas mediterráneas durante el Cuaternario. Todo ello nos llevó a plantear un nuevo estudio que evaluase la diversidad genética en las poblaciones pirenaicas de esta especie, donde destacan singularmente los Pirineos oscenses, con multitud de citas y poblaciones descritas para *Silene ciliata*. Empleando marcadores de ADN del plasto, planteamos un rastreo de la diversidad genética de la especie y buscamos haplotipos únicos que apoyen la singularidad de la región.

TAREAS REALIZADAS, MATERIALES Y METODOLOGÍA

Para este estudio se han realizado una serie de tareas complementarias para conocer mejor las poblaciones de *Silene ciliata* en el Pirineo oscense y otras localidades limítrofes.

Revisión de herbarios

En una primera aproximación, se optó por revisar pliegos de esta especie procedentes de diferentes herbarios. Se anotaron las principales características de dichos pliegos (coordinadas, localidad de procedencia, altitud, recolector, fecha, etcétera) y se consultó a expertos en flora pirenaica sobre poblaciones accesibles para organizar una campaña de recolección. Esta revisión también sirvió para aconsejar la reevaluación de algunos pliegos mal clasificados como *Silene ciliata*. Un resumen de esta revisión de pliegos aparece en la tabla I. Finalmente, de aquellos pliegos de especial relevancia y bien conservados, se tomaron pequeñas muestras de tejido seco (con la autorización de los conservadores) para los análisis posteriores de ADN. Un resumen de las muestras analizadas y sus características aparece en la tabla II.

Tabla I. Individuos seleccionados para los análisis de este proyecto, de los cuales se han tomado muestras de tejidos vegetales.

<i>Herbario</i>	<i>Pliegos revisados</i>
Real Jardín Botánico de Madrid (CSIC)	16
Sociedad de Ciencias Aranzadi San Sebastián	16
Institut Botànic de Barcelona (CSIC)	11
Centro de Biodiversidad Vegetal de Barcelona	26
Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC)	48
<i>Total</i>	<i>117</i>

Recolección en campo

Durante el mes de julio, se realizó una campaña de muestreos de campo (fig. 2), para visitar algunas de las poblaciones de esta especie. Esta expedición nos permitió tomar muestras adicionales a las obtenidas del material procedente de los herbarios (y de mayor calidad, dado que en los procesos de prensado y almacenaje, el ADN se ve irremediamente dañado), así como conocer las poblaciones naturales de la especie en los Pirineos oscenses. Las poblaciones visitadas aparecen en la tabla II y en la figura 3, incluyendo aquellos individuos que están pendientes de indexar en el herbario.



Fig. 2. Recolectando muestras en el collado de Sahún.

Tabla II. Individuos seleccionados para los análisis de este proyecto, de los cuales se han tomado muestras de tejidos vegetales (el símbolo – hace referencia a dato desconocido).

<i>Localidad</i>	<i>Acrónimo</i>	<i>Provincia</i>	<i>Altitud</i>	<i>Coordenadas</i>	<i>Herbario</i>
Monte San Donato	DON	Navarra	1400	WN8448	MA465480
Barranco de la Foya	FOY	Huesca	—	—	MA515225
Alt Urgell, Port del Compte, Prat d'Arderic	URG	Lérida	1900	31TCG77	MA332711
Legazpi, Katabera	KAT	Guipúzcoa	1200	30TWN5159	ARAN564115
Ibón del Cau, Bielsa, pastos sobre esquistos	CAU	Huesca	2325	31TBH7726	ARAN67322
Ansó, Bajo Acherito	ACHE	Huesca	1850	30TXN8749	ARAN052466
Bielsa, Portillo de Tella	TENA	Huesca	1900	31TBH6921	ARAN48032
Isaba, subida a Lakarra	LAK	Navarra	1700	30TXN7657	ARAN18608
Isaba, Ezkaurre hegoaldara	EZK	Navarra	1900	30TXN7646	ARAN18600
Andorra, La Masana, port de Cabús	AND	Andorra	2370	31TCH71	ARAN66488
Valle de Llauset, collado de Vallibierna	VALL	Huesca	—	31TCH01	ARAN18604
Tarazona, Zaragoza, Moncayo. Circo de Morca, Camino Bellido	MON	Zaragoza	1684	30TWM9892	BCN31794
Collado de Baciber, Cerler	CER	Huesca	—	31TCH0214	J0185289
Collado de Sahún, Chía	SAH	Huesca	1800	31TBH8648	Pendiente
Punta Acuta, Torla	ACU	Huesca	2100	30TYN4060	Pendiente
Ibón del Acherito, Ansó	ACHE2	Huesca	1850	30TXN8723	Pendiente

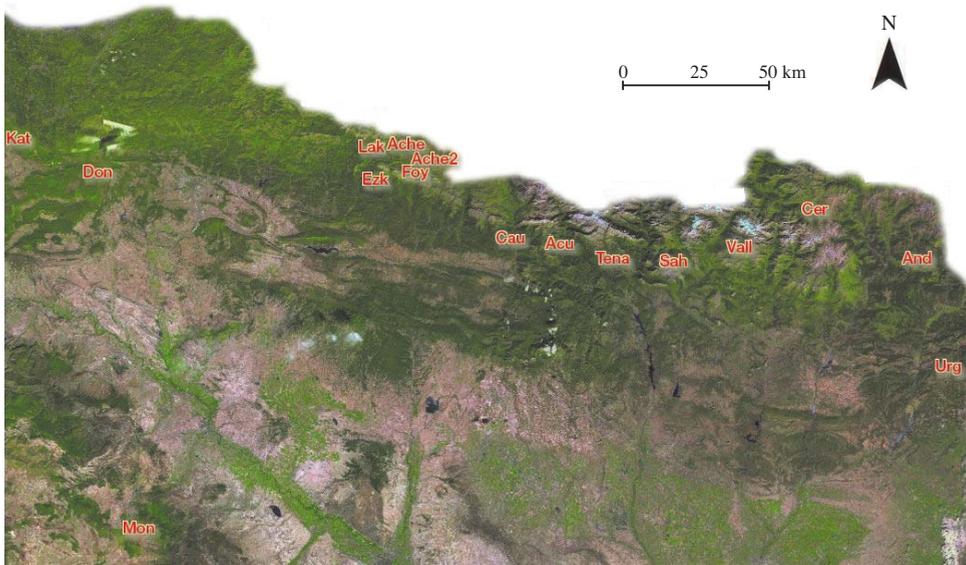


Fig. 3. Mapa de localización de las poblaciones estudiadas.
(La cartografía base procede del PNOA, Instituto Geográfico Nacional)

Métodos analíticos: análisis de laboratorio, extracción de ADN, amplificación y secuenciación

A lo largo del verano de 2015 se realizaron las tareas de laboratorio consistentes en la extracción de ADN de las muestras, la amplificación de tres regiones del ADN del plasto y su secuenciación.

Para la extracción de ADN (fig. 4) se siguió el protocolo estándar del kit de extracción de ADN de la marca comercial Qiagen (CA, EE. UU.), con leves modificaciones para optimizar el proceso de extracción. La extracción se realizó a partir de 20 miligramos de tejido seco en buen estado (sin daños externos, marcas de deshidratación, etcétera). Nuestra experiencia con este kit es prolongada y los resultados son satisfactorios con la mayoría de las especies con las que trabajamos (fig. 3). Todas las extracciones se comprobaron con geles de agarosa al 1% teñidos con Red-Gel (Biotium, CA, EE. UU.).

Para la amplificación del ADN del plasto, se emplearon tres regiones específicas de alta capacidad resolutive: *rbcL*, *rps16* y *trnL*. La primera (*rbcL*) es una región muy conservada (esto es, con poca variación), recomendada para



Fig. 4. Proceso de extracción de ADN y gel de comprobación.

las técnicas de *barcodeing* (identificación) de plantas (GARCÍA-FERNÁNDEZ y cols., 2012b; HOLLINGSWORTH y cols., 2009). Las otras dos (*rps16* y *trnL*) presentan mayor variabilidad y pueden encontrarse algunas diferencias entre las poblaciones. Con el uso combinado de las tres regiones esperamos poder confirmar la correcta identificación de las muestras como *Silene ciliata* y evaluar las diferencias entre poblaciones. Las tres regiones han sido usadas con anterioridad en la especie y han permitido realizar con éxito otros estudios con ella (KYRKOU y cols., 2015).

El proceso de amplificación del ADN se realizó mediante reacciones PCR empleando las Pure To Go PCR beads (GE Healthcare, Upsala, Suecia). El protocolo de PCR consiste en un periodo de 4 minutos a 94 °C, seguido por un número variable de ciclos (entre 30 y 35) de 94 °C durante 30 segundos, 50 o 53 °C (en función del éxito de la reacción y la región que se pretenda estudiar) durante 45 segundos y 72 °C durante 45 segundos, para finalizar con un proceso de elongación de 72 °C durante 7 minutos. Todas las reacciones se comprobaron con geles de agarosa al 1%. Para la amplificación de la región *rbcL* empleamos los cebadores *rbcLS1 F* y *R*; para la región *rps16* empleamos los cebadores *rpsF2a* y *rpsR2* y para la región *trnL*, los cebadores *trnLc* y *trnLd*. La secuencia de estos cebadores pueden encontrarse en TABERLET y cols. (1991) o SHAW y cols. (2005, 2007).

Para completar la secuenciación de estas regiones, se realizó una reacción de purificación empleando el reactivo Exostar (Illustra, GE Healthcare, Upsala, Suecia). Posteriormente, se secuenciaron los fragmentos empleando un secuenciador ABI 3730XL (Applied Biosystems, CA, EE. UU.) disponible en la Unidad de Genética de la Universidad Complutense de Madrid.

Alineamiento, evaluación de calidad y análisis de secuencias

Las secuencias se revisaron empleando el programa Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corp, MI, EE. UU.), corrigiendo aquellas posiciones ambiguas o con baja resolución. Posteriormente, se emplearon los programas MAFFT (KATOY y STANDLEY, 2013) y GBLOCKS (CASTRESANA, 2000) para agrupar todas las secuencias y realizar el alineamiento de ellas. Si bien del empleo de ambos *software* resulta una aproximación muy conservadora (TALAVERA y CASTRESANA, 2007), preferimos que los análisis que se realicen sean lo suficientemente fiables como para sostener nuestras conclusiones.

Para realizar una comparación con otras poblaciones, se añadieron secuencias de las mismas regiones de otras especies o poblaciones (llamadas *outgroups*):

- Dos individuos de *Silene ciliata*, procedentes de poblaciones del Sistema Central: Peña del Águila, Salamanca (acrónimo *Agi*) y Cabezas de Hierro, Parque Nacional del Guadarrama, Madrid (CabH).
- Individuos de *Silene vulgaris*, como especie de amplia distribución del género (acrónimo *Sil_vul*) y *Silene acaulis*, como especie alpina del género (*Sil_aca*).
- Individuos de *Saponaria caespitosa* (acrónimo *Sap*), como especie que cohabita junto con *Silene ciliata* en las poblaciones del Pirineo.

Las secuencias se analizaron con un dendograma de tipo Neighbour Joining empleando el *software* Splittree 4.1.4 (HUSON y BRYANT, 2006). Para evaluar la significación de las medidas, se realizó un test *bootstrapping* con 1000 réplicas. En los árboles que se muestran a continuación (figs. 5, 6 y 7) solo se muestran aquellos valores que fueron significativos en el test, lo cual significa una probabilidad posterior (PP) superior a 90.

PRINCIPALES RESULTADOS

Los resultados se muestran por regiones analizadas y se comentan cada una de ellas de manera independiente. Las secuencias han sido enviadas al repositorio público GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), pendientes de obtener los números de referencia correspondientes.

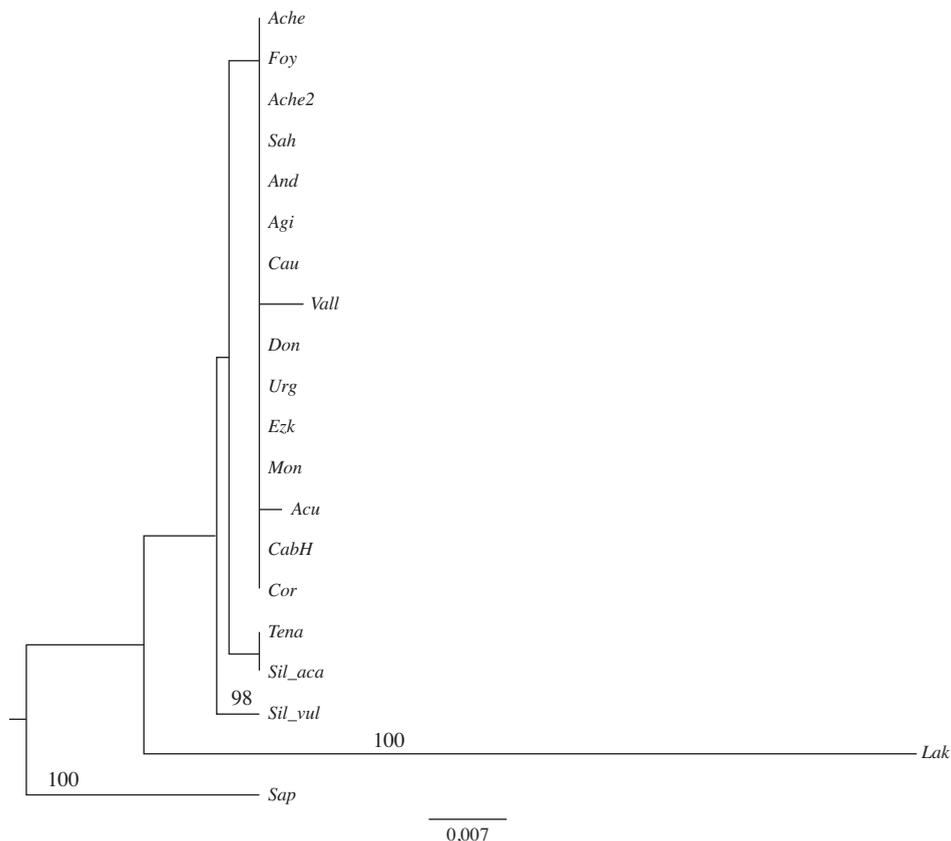


Fig. 5. Dendrograma NJ con la región *rbcL*. Solo se muestran los valores que tras el análisis presentaron una PP mayor de 90.

Región *rbcL*

Todos los individuos amplificaron de manera satisfactoria para esta región. La región tuvo una longitud de 552 pares de bases (fig. 5). Los análisis muestran poca variabilidad entre los individuos, esperable debido a la alta conservación filogenética de esta región. La muestra de *Saponaria caespitosa* queda agrupada fuera del conjunto de individuos del género *Silene*. Queda por destacar las muestras de Lak y Tena, que se agrupan fuera del resto de individuos de la especie *Silene ciliata*. Los individuos Vall y Acu también mostraron algunas diferencias en las secuencias, destacando su singularidad. Los resultados se ofrecen por regiones.

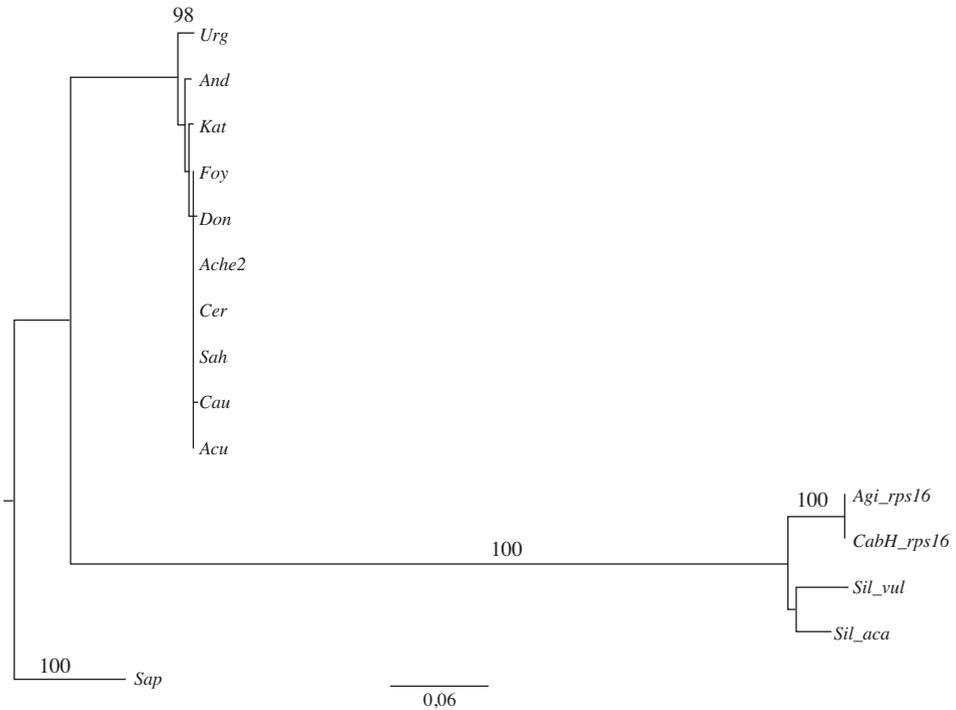


Fig. 6. Dendrograma NJ con la región *rps16*. Solo se muestran los valores que tras el análisis presentaron una PP mayor de 90.

Región *rps16*

Para la región *rps16* solo se obtuvieron secuencias de calidad suficiente para diez individuos (Don, Foy, Urg, Kat, Cau, And, Cer, Sah, Acu y Ache2), así como para los *outgroups* (fig. 6). Después de los procesos de depurado se obtuvo una región de 391 pares de bases. El resultado nos ofrece una gran diferenciación de las muestras estudiadas, no solo de los *outgroups*, sino también de las poblaciones del Sistema Central. En este caso fueron las muestras de Urg y And las que mostraron pequeñas diferencias respecto al resto de individuos del Pirineo.

Región *trnL*

La amplificación de la región *trnL* fue complicada y muchas secuencias fueron erróneas. Apenas contamos con una región de 100 pares de bases y

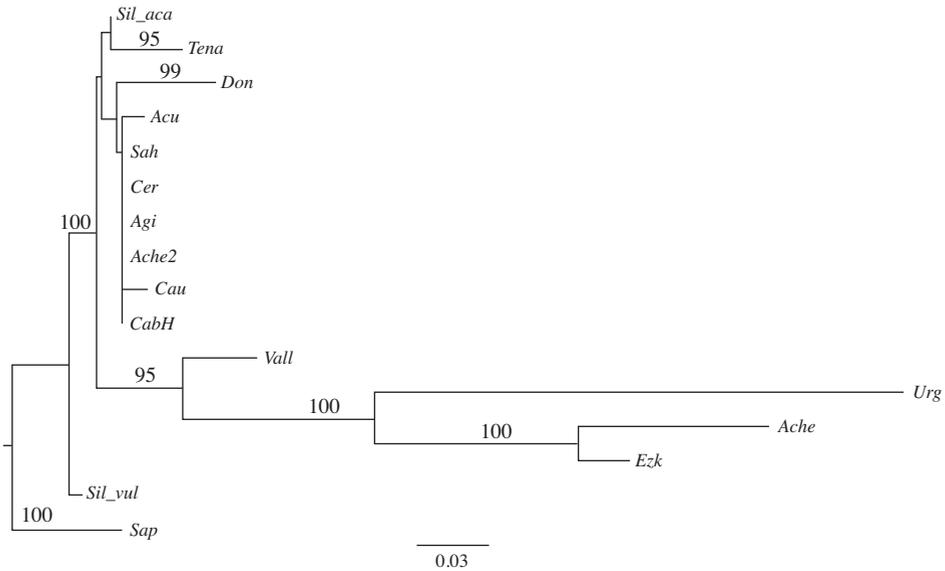


Fig. 7. Dendrograma NJ con la región *trnL*. Solo se muestran los valores que tras el análisis presentaron una PP mayor de 90.

solo pudimos hacer el análisis (fig. 7) con ocho individuos del Pirineo (Cau, Ache, Ezk, Vall, Cer, Sah, Acu, Ache2). Todo esto nos lleva a plantear que los resultados que se obtengan con esta región deben ser interpretados con mucha cautela. Sin embargo, los resultados del análisis fueron congruentes, separando tanto a *Saponaria caespitosa* como a las otras especies de *Silene*. En este caso, las mayores diferencias fueron en los individuos Ezk, Ache, Urg y Vall, y menores en Don y Acu. Los individuos de otras poblaciones quedaron situados junto con otros individuos del Pirineo. Por otro lado, las secuencias de otras especies del genero *Silene* aparecen en distintas partes del dendrograma, lo cual plantea las limitaciones del análisis.

CONCLUSIONES

- Los Pirineos son un reservorio singular de diversidad genética para la especie *Silene ciliata*. Aunque se usen marcadores conservadores de reducida variabilidad, los análisis detallaron haplotipos únicos hasta ahora inéditos. Las poblaciones oscenses de esta especie son esenciales para conocer su historia evolutiva y sus características.

- Esta gran diversidad resalta el papel ya conocido de los Pirineos como refugio de especies y diversidad durante los periodos glaciares-interglaciares para este tipo de especies de montaña, así como una zona de hibridación donde varios linajes han podido coexistir y desarrollarse.
- A la hora de realizar estudios de este tipo, resulta imprescindible efectuar un muestreo exhaustivo y detallado, debido a que a pequeña escala se puede encontrar una importante variabilidad genética. El mantenimiento de los herbarios, del material allí depositado, y la experiencia de los investigadores y los aficionados a la botánica son esenciales para el estudio de estas especies.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con una Ayuda de Investigación del Instituto de Estudios Altoaragoneses en su convocatoria de 2014. El autor agradece los comentarios de Luis Villar (Instituto Pirenaico de Ecología, CSIC) sobre la flora pirenaica, que han enriquecido este trabajo, así como la colaboración desinteresada de varios alumnos de la Universidad Rey Juan Carlos para el trabajo de campo y laboratorio. Por último, agradecemos al personal del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido y del Instituto Aragonés de Gestión Ambiental los permisos para trabajar en las montañas de Aragón.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELL, G., y A. GONZÁLEZ (2009). Evolutionary rescue can prevent extinction following environmental change. *Ecology Letters*, 12 (9): 942-948.
- BERGMANN, J., S. POMPE, R. OHLEMULLER, M. FREIBERG, S. KLOTZ y I. KUHN (2010). The Iberian Peninsula as a potential source for the plant species pool in Germany under projected climate change. *Plant Ecology*, 207 (2): 191-201.
- BLACKBURN, K. B. (1933). On the relation between geographic races and polyploidy in *Silene ciliata* Pourr. *Genetica*, 15 (1): 49-66.
- CASTRESANA, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17 (4): 540-552.
- DOBLAS-MIRANDA, E., J. MARTÍNEZ-VILALTA, F. LLORET, A. ÁLVAREZ, A. ÁVILA, F. J. BONET, L. BROTONS, J. CASTRO, J. C. YUSTE, M. DÍAZ, P. FERRANDIS, E. GARCÍA-HURTADO, J. M.^a IRIONDO, T. F. KEENAN, J. LATRON, J. LLUSIA, L. LOEPFE, M. MAYOL, G. MORE,

- D. MOYA, J. PEÑUELAS, X. PONS, R. POYATOS, J. SARDANS, O. SUS, V. R. VALLEJO, J. VAYREDA y J. RETANA (2015). Reassessing global change research priorities in mediterranean terrestrial ecosystems: How far have we come and where do we go from here? *Global Ecology and Biogeography*, 24 (1): 25-43.
- DUARTE, C. M.^a (2006). *Cambio global: impacto de la actividad humana sobre el sistema Tierra*. CSIC. Madrid.
- ENGLER, R., C. F. RANDIN, W. THUILLER, S. DULLINGER, N. E. ZIMMERMANN, M. B. ARAÚJO, P. B. PEARMAN, G. LE LAY, C. PIEDALLU, C. H. ALBERT, P. CHOLER, G. COLDEA, X. de LAMO, T. DIRNBÖCK, J.-C. GÉGOUT, D. GÓMEZ-GARCÍA, J.-A. GRYTNES, E. HEEGAARD, F. HØISTAD, D. NOGUÉS-BRAVO, S. NORMAND, M. PUSCAS, M.-T. SEBASTIÀ, A. STANISCI, J.-P. THEURILLAT, M. R. TRIVEDI, P. VITTOZ y A. GUISAN (2011). 21st century climate change threatens mountain flora unequally across Europe. *Global Change Biology*, 17 (7): 2330-2341.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. (2011). Cambio climático en alta montaña: una perspectiva genética. *Ecosistemas*, 20 (2): 129-132.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, A., J. M.^a IRIONDO, J. VALLÉS, J. ORELLANA y A. ESCUDERO (2012a). Ploidy level and genome size of locally adapted populations of *Silene ciliata* across an altitudinal gradient. *Plant Systematics and Evolution*, 298 (1): 139-146.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, A., J. M.^a IRIONDO y A. ESCUDERO (2012b). Inbreeding at the edge: Does inbreeding depression increase under more stressful conditions? *Oikos*, 121 (9): 1435-1445.
- GARCÍA-VALDÉS, R., N. J. GOTELLI, M. Á. ZAVALA, D. W. PURVES y M. B. ARAÚJO (2015). Effects of climate, species interactions, and dispersal on decadal colonization and extinction rates of Iberian tree species. *Ecological Modelling*, 309: 118-127.
- GARGANO, D., G. PELLEGRINO y L. BERNARDO (2015). Genetic and fitness consequences of interpopulation mating in *Dianthus guliae* Janka: Conservation implications for severely depleted and isolated plant populations. *Conservation Genetics*, 16 (5): 1127-1138.
- GIMÉNEZ-BENAVIDES, L., A. ESCUDERO y F. PÉREZ-GARCÍA (2005). Seed germination of high mountain Mediterranean species: Altitudinal, interpopulation and interannual variability. *Ecological Research*, 20 (4): 433-444.
- HARE, F. K. (1964). Changes of Climate – UNESCO. *Geographical Review*, 54 (3): 455-457.
- HOFFMANN, A. A., y C. M. SGRO (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470 (7335): 479-485.
- HOLLINGSWORTH, P. M., L. L. FORREST, J. L. SPOUGE, M. HAJIBABAEI, S. RATNASINGHAM, M. VAN DER BANK, M. W. CHASE, R. S. COWAN, D. L. ERICKSON, A. J. FAZEKAS, S. W. GRAHAM, K. E. JAMES, K.-J. KIM, W. J. KRESS, H. SCHNEIDER, J. VAN ALPHENSTAHL, S. C. H. BARRETT, C. VAN DEN BERG, D. BOGARIN, K. S. BURGESS, K. M. CAMERON, M. CARINE, J. CHACÓN, A. CLARK, J. J. CLARKSON, F. CONRAD, D. S. DEVEY, C. S. FORD, T. A. J. HEDDERSON, M. L. HOLLINGSWORTH, B. C. HUSBAND, L. J. KELLY, P. R. KESANAKURTI, J. S. KIM, Y.-D. KIM, R. LAHAYE, H.-L. LEE, D. G. LONG, S. MADRIÑÁN,

- O. MAURIN, I. MEUSNIER, S. G. NEWMASER, C.-W. PARK, D. M. PERCY, G. PETERSEN, J. E. RICHARDSON, G. A. SALAZAR, V. SAVOLAINEN, O. SEBERG, M. J. WILKINSON, D.-K. YI y D. P. LITTLE (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (31): 12794-12797.
- HUFBAUER, R. A., M. SZUCS, E. KASYON, C. YOUNGBERG, M. J. KOONTZ, C. RICHARDS, T. TUFF y B. A. MELBOURNE (2015). Three types of rescue can avert extinction in a changing environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (33): 10557-10562.
- HUSON, D. H., y D. BRYANT (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23 (2): 254-267.
- IPCC (2013). *Climate change 2013: The physical science basis*. Cambridge UP. Nueva York.
- JUMP, A., y J. PEÑUELAS (2005). Running to stand still: Adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology Letters*, 8 (9): 1010-1020.
- KATO, K., y D. M. STANDLEY (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (4): 772-780.
- KYRKOU, I., J. M.^a IRIONDO y A. GARCÍA-FERNÁNDEZ (2015). A glacial survivor of the alpine Mediterranean region: Phylogenetic and phylogeographic insights into *Silene ciliata* Pourr. (Caryophyllaceae). *PeerJ*, 3: e1193.
- LANGDON, J. G. R., y J. J. LAWLER (2015). Assessing the impacts of projected climate change on biodiversity in the protected areas of western North America. *Ecosphere*, 6 (5): 1-14.
- LARA-ROMERO, C., J. J. ROBLEDO-ARNUNCIO, A. GARCÍA-FERNÁNDEZ y J. M.^a IRIONDO (2014). Assessing intraspecific variation in effective dispersal along an altitudinal gradient: A test in two Mediterranean high-mountain plants. *PLoS One*, 9 (1): e87189.
- MILLENNIUM ECOSYSTEMS ASSESSMENT (MEA) (2005). *Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis*. Island Press. Washington DC.
- PARMESAN, C. (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37 (1): 637-669.
- SHAW, J., E. B. LICKY, J. T. BECK, S. B. FARMER, W. LIU, J. MILLER, K. C. SIRIPUN, C. T. WINDER, E. E. SCHILLING y R. L. SMALL (2005). The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92 (1): 142-166.
- SHAW, J., E. B. LICKY, E. E. SCHILLING y R. L. SMALL (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94 (3): 275-288.
- SKELLY, D. K., L. N. JOSEPH, H. P. POSSINGHAM, L. K. FREIDENBURG, T. J. FARRUGIA, M. T. KINNISON y A. P. HENDRY (2007). Evolutionary responses to climate change. *Conservation Biology*, 21 (5): 1353-1355.

- TABERLET, P., L. GIELLY, G. PAUTOU y J. BOUVET (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17 (5): 1105-1109.
- TALAVERA, G., y J. CASTRESANA (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 56 (4): 564-577.
- THUILLER, W., C. ALBERT, M. B. ARAÚJO, P. M. BERRY, M. CABEZA, A. GUIBAN, T. HICKLER, G. F. MIDGLEY, J. PATERSON, F. M. SCHURR, M. T. SYKES y N. E. ZIMMERMANN (2008). Predicting global change impacts on plant species' distributions: Future challenges. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 9 (3-4): 137-152.
- THUILLER, W., S. LAVOREL, M. B. ARAÚJO, M. T. SYKES y I. C. PRENTICE (2005). Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (23): 8245-8250.
- TUTIN, T. G., V. H. HEYWOOD, N. A. BURGESS, D. H. VALENTINE, S. M. WALTERS y D. A. WEBB (1995). *Flora Europaea*. Cambridge UP. Cambridge. 629 pp.
- WALTHER, G. R. (2010). Community and ecosystem responses to recent climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365 (1549): 2019-2024.
- WHITELEY, A. R., S. W. FITZPATRICK, W. C. FUNK y D. A. TALLMON (2015). Genetic rescue to the rescue. *Trends in Ecology & Evolution*, 30 (1): 42-49.
- WIENS, J. A., N. E. SEAVY y D. JONGSOMJIT (2011). Protected areas in climate space: What will the future bring? *Biological Conservation*, 144 (8): 2119-2125.