



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Estudio del complejo poliploide euro-mediterráneo del género *Anthoxanthum* L.



Trabajo de Fin de Grado

Eloy Álvarez López

2013-14



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Estudio del complejo poliploide euro-mediterráneo del género *Anthoxanthum* L.

Estudo do complexo poliploide euro-mediterráneo do xénero *Anthoxanthum* L.

Study of the Euro-Mediterranean polyploid complex of genus *Anthoxanthum* L.

Trabajo de Fin de Grado

Eloy Álvarez López

2013-14

Manuel Pimentel Pereira

Elvira Sahuquillo Balbuena



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTADE DE CIENCIAS

TRABALLO DE FIN DE GRAO

Os Doutores Manuel Pimentel Pereira e Elvira Sahuquillo Balbuena autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao titulado: “*Estudio del complejo poliploide euro-mediterráneo del género Anthoxanthum*” presentado por Eloy Álvarez López para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

A Coruña, 22 de Xullo de 2014

Manuel Pimentel Pereira

Elvira Sahuquillo Balbuena

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	23
ANEXO I	25

RESUMEN

En este estudio se ha llevado a cabo el análisis filogenético del complejo poliploide que conforman las especies europeas del género *Anthoxanthum* L. y las afines del E de África. Para ello se analizaron 4 regiones de ADN, 2 cloroplásticas y 2 nucleares en ejemplares pertenecientes a 82 poblaciones repartidas por Europa, Macaronesia y Este de África correspondientes a 10 especies. Para estudiar las relaciones filogenéticas se aplicaron métodos de máxima parsimonia e inferencia bayesiana. Las topologías de los árboles obtenidos con las matrices cloroplástica y nuclear presentaron diferencias significativas, por lo que se analizaron de forma independiente.

Como resultado de los análisis realizados se observó que *Anthoxanthum* es monofilético con respecto a su género hermano *Hierochloë*. Asimismo, *A. gracile* es la especie más diferenciada del complejo, lo que refleja su naturaleza relictiva. El resto de las especies/poblaciones muestran estructura biogeográfica, separándose un clado con las poblaciones del centro y norte de Europa, perennes y otro con las mediterráneas y Macaronésicas, en general anuales. Además se puede establecer que las especies poliploides se han originado en repetidas ocasiones durante la evolución reciente del género. También se observa un origen diferente de las dos especies Africanas incluidas en el estudio (*A. aethiopicum* y *A. nivale*), por lo que se deduce que la colonización del continente africano se ha producido en más de una ocasión.

RESUMO

Neste estudo levouse a cabo a análise filoxenética do complexo poliploide que conforman as especies europeas do xénero *Anthoxanthum* L. e as afíns do Leste de África. A análise realizouse a través do estudo de 4 rexións de ADN, 2 cloroplásticas e 2 nucleares en exemplares pertencentes a 82 poboacións repartidas por Europa, Macaronesia e Leste de África correspondentes a 10 especies. Para estudar as relacións filoxenéticas aplicáronse métodos de máxima parsimonia e inferencia bayesiana. As topoloxías das árbores obtidas coas matrices cloroplástica e nuclear presentaron diferenzas significativas, polo que analizáronse de xeito independente.

Como resultado das análises realizadas observouse que *Anthoxanthum* é monofilético con respecto a seu xénero irmán *Hierochloë*. Ademais, *A. gracile* é a especie máis diferenciada do complexo, o que reflicte a súa natureza relictiva. O resto das especies/poboacións amosan estrutura bioxeográfica, separándose un clado coas poboacións do centro e norte de Europa, perennes e outro coas mediterráneas e Macaronésicas, polo xeral anuais. Tamén se pode establecer que as especies poliploides orixináronse en repetidas ocasións durante a evolución recente do xénero. Finalmente, obsérvase unha orixe diferente das dúas especies africanas incluídas no estudo (*A. aethiopicum* y *A. nivale*), polo que se deduce que a colonización do continente africano produciuse en máis dunha ocasión.

INTRODUCCIÓN

Anthoxanthum L. *sensu stricto* (sin incluir el género *Hierochloë* R.Br.) es un género de plantas vasculares, perteneciente a la familia Poaceae (gramíneas), compuesto por 18-22 especies morfológicamente semejantes pero de alta diversidad ecológica, biogeográfica y en lo referido a sus niveles de ploidía (Hedberg, 1990). El género incluye especies anuales y perennes, que se distribuyen por las regiones templadas y subárticas de Europa y Asia, en las altas montañas de zonas tropicales de África y el SE Asiático y en Sudáfrica. Algunas de las especies del género presentan un marcado carácter invasor (*Anthoxanthum odoratum* L.), habiendo sido introducidas en extensas áreas de América y Australia.

El género fue descrito por Linneo en 1753, y debe su nombre a la coloración de sus panículas después de la floración (*anthos*, del griego, flor; *xhantos* del griego, amarillo). Tradicionalmente, el género *Anthoxanthum* se ha incluido dentro de la tribu Phalaridae, junto con los géneros *Phalaris* L. y *Hierochloë* R.Br. (GPWG, 2001; Davis & Soreng, 2007). Estos géneros tienen en común que las espiguillas están constituidas por tres flores, la superior siempre hermafrodita con dos estambres, y las dos inferiores con distintos niveles de reducción de sus piezas florales (Schouten & Veldkamp, 1985). Si bien la proximidad entre los géneros *Anthoxanthum* y *Hierochloë* ha sido demostrada mediante métodos moleculares (Quintanar *et al.*, 2007), la Tribu Phalaridae no resultó monofilética, por lo que en la actualidad se considera monogenérica (incluyendo únicamente *Phalaris*) mientras que *Anthoxanthum* y *Hierochloë* se incluyen en la Subtribu Anthoxanthinae dentro de la Supertribu Aveneae-Poeae (Quintanar *et al.*, 2007).

La diferenciación entre *Anthoxanthum* y *Hierochloë* se establece en base a la estructura floral. *Anthoxanthum* presenta dos flores inferiores estériles y, a menudo, reducidas a lemas (Fig. 1). *Hierochloë*, sin embargo, tiene dos flores inferiores masculinas con 3 estambres cada una. Entre ambos géneros existen, sin embargo, formas intermedias, lo que ha llevado a distintos autores a proponer su fusión (Schouten & Veldkamp, 1985). *Anthoxanthum* y *Hierochloë* comparten además altas concentraciones de un compuesto aromático llamado cumarina, pero se diferencian en su número básico de cromosomas, siendo $x=5$ para *Anthoxanthum* y $x=7$ para *Hierochloë*. Dentro de *Anthoxanthum* se distinguen dos secciones en base a su morfología floral, sección *Anthoxanthum* y

sección *Ataxia*. La sección *Anthoxanthum* comprende 9-10 especies anuales y perennes, y presenta una gran diversidad en su nivel de ploidía. La sección *Ataxia* contiene entre 7 y 10 especies cuyas características florales son intermedias entre la sección *Anthoxanthum* y el género *Hierochloë*, debido a la presencia de una flor apical femenina o hermafrodita, y dos flores inferiores masculinas, todas ellas con lodículas. Estas formas han sido incluidas en *Anthoxanthum* o en *Hierochloë* por diferentes autores (Stapf, 1898-1900; Pohl, 1972). Estudios recientes han hallado evidencias que apoyan el carácter híbrido de la sección *Ataxia* (Pimentel *et al.*, 2013).



Figura 1.- Esquema de la estructura floral de *Anthoxanthum*. Autor: David Romero

El interés que presenta el género *Anthoxanthum* frente a otros géneros es que puede ser un buen modelo para el estudio de la evolución de las gramíneas C3. En primer lugar, presenta una distribución geográfica y una ecología semejante a la de otras gramíneas con el mismo modelo metabólico. Asimismo, el género presenta una alta variabilidad en los niveles de ploidía y una alta capacidad de introgresión (Pimentel & Sahuquillo, 2010), lo que lo convierte en un modelo adecuado para el estudio de la evolución

reticulada, común en las gramíneas. Finalmente, el número de especies, relativamente bajo, que constituye este género hace que su estudio sea más abordable.

En este trabajo nos centraremos en analizar las especies pertenecientes a la sección *Anthoxanthum*, que habitan en todo el continente europeo (y zonas templadas del N de Asia hasta Japón), en la cuenca Mediterránea y en la Macaronesia. Estas especies son: *A. odoratum* L., *A. alpinum* Löve & Löve, *A. gracile* Bivona, *A. aristatum* Boiss., *A. amarum* Brot., *A. ovatum* Lag. y *A. maderense* Teppner. También se incluirán en el análisis muestras recolectadas en la Isla de la Palma que aún no han sido caracterizadas morfológicamente (Santos Guerra, comunicación personal). Asimismo, se incluyen especímenes pertenecientes a dos especies que se localizan en zonas de alta montaña (afroalpinas) del este de África (Etiopía, Tanzania, Kenya y Uganda): *A. nivale* K. Schum. y *A. aethiopicum* Hedberg, cuyo origen parece estar relacionado con la flora europea. *Anthoxanthum nivale* pertenece a la sección *Anthoxanthum*, y en diferentes estudios se ha visto su relación filogenética con las especies europeas (Pimentel *et al.* 2013). Por su parte, *A. aethiopicum* no ha sido incluida en ningún análisis filogenético hasta la fecha, por lo que no se conoce su relación con las restantes especies del género *Anthoxanthum*, aunque sus características morfológicas parecen indicar que también pertenece a esta sección. Por otro lado, numerosos estudios han señalado la proximidad entre la flora afroalpina y la de las montañas europeas, resultado de los cambios climáticos y geológicos durante el Pleistoceno (i.e. glaciaciones y variaciones en el nivel del mar) que llevaron al establecimiento de rutas migratorias a través de la Península Arábiga y Asia Menor (e.g. Assefa *et al.*, 2007).

Entre las especies de ciclo de vida perenne, la especie más abundante y con mayor rango de distribución geográfica es *A. odoratum* (Fig. 2), especie tetraploide que aparece por todo el norte de Eurasia. Una especie muy relacionada a ésta, es *A. alpinum*, considerada en un principio como un citotipo diploide de *A. odoratum* que aparece en zonas de alta montaña. La diferenciación morfológica no ambigua entre ambas especies es imposible, y diferentes estudios filogenéticos han demostrado que ninguna de estas especies tiene un origen monofilético (Pimentel *et al.*, 2013).



Figura 2: Porte y detalle floral de *Anthoxanthum odoratum*. Tomado de www.biolib.de

La otra especie perenne Europea es *A. amarum*, endémica del Noroeste de la Península Ibérica, que es poliploide ($2n=18x=90$ cromosomas) y se caracteriza por su gran porte, la anchura de sus hojas superior 1 cm y sus lemas estériles mayores de 1 cm. Las otras especies perennes de la sección *Anthoxanthum* son *A. maderense*, endémica de Madeira, diploide, y típica de zonas altas y expuestas; y las especies africanas. *A. nivale* y *A. aethiopicum*. Ambas se distribuyen en montañas del este del continente africano, aunque la distribución de *A. nivale* es muy amplia (Kenya, Tanzania, Uganda y Etiopía), mientras que *A. aethiopicum* solo aparece en Etiopía. *Anthoxanthum nivale* constituye un complejo poliploide en el que se incluyen plantas tetraploides y dodecaploides de gran porte y estoloníferas. Por su parte, *A. aethiopicum* se caracteriza por ser tetraploide, de menor talla y no estolonífera (Hedberg, 1976).

En cuanto a las especies de ciclo de vida anual destacan las mediterráneas *A. ovatum* y *A. aristatum*, de distribución late-mediterránea. Ambos taxa son de difícil caracterización morfológica, y su diferenciación se basa en caracteres de la lema estéril (Valdés, 1973). Sin embargo, la alta variabilidad intraespecífica para este carácter hace que algunos autores duden de la separación entre ambos (López González, 1994). Finalmente, *A. gracile*, con flores de gran tamaño, se trata de una especie relictica que solo crece en algunas de las islas del Mediterráneo (Malta, Creta, Cerdeña).

La distribución, nivel de ploidía y el ciclo de vida de las especies del género *Anthoxanthum* se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1.- Lista de especies incluidas en el estudio y sus principales características.

Especies	Ploidía	Distribución geográfica	Ciclo de vida
<i>A. aethiopicum</i>	4x	Etiopía	Perenne
<i>A. alpinum</i>	2x	N Eurasia. Zonas de alta montaña	Perenne
<i>A. amarum</i>	18x	NW Península Ibérica	Perenne
<i>A. maderense</i>	2x	Macaronesia	Perenne
<i>A. nivale</i>	4x, 12x	E África	Perenne
<i>A. odoratum</i>	4x	Eurasia	Perenne
<i>A. aristatum</i>	2x	Mediterráneo	Anual
<i>A. gracile</i>	2x	Mediterráneo	Anual
<i>A. ovatum</i>	2x	Mediterráneo	Anual
<i>Anthoxanthum sp.</i>	Desconocido	Macaronesia	Anual

Objetivos

El objetivo de este estudio es elaborar un estudio filogenético de las especies de *Anthoxanthum*, sección *Anthoxanthum* para resolver las siguientes cuestiones:

-¿Se aprecian patrones biogeográficos claros en las especies europeas del género?

-¿Se han originado los poliploides una vez o en repetidas ocasiones?

– ¿Cuál es la relación entre las especies europeas y las que crecen en África Oriental?

¿Tienen las especies africanas un origen monofilético?

Para la consecución de estos objetivos se han empleado técnicas de análisis filogenético, bayesianas y de parsimonia, sobre regiones del ADN cloroplástico y nuclear.

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen de las muestras y secuencias empleadas

Para la consecución de los objetivos planteados se obtuvieron representantes de todas las especies de la sección *Anthoxanthum*, que incluye a todos los táxones del género que crecen en Eurasia y África Oriental. Estas especies constituyen un grupo monofilético según los últimos estudios realizados (Pimentel *et al.*, 2013). En la selección de poblaciones se empleó un criterio geográfico, intentando cubrir al máximo posible el área de distribución del género en Europa y el E de África (Anexo I). Para la elaboración de este trabajo se emplearon 430 secuencias (103 de ETS, 125 de ITS, 88 de *trnLF*, 114 de *trnTL*) procedentes de 82 poblaciones de 10 especies del género *Anthoxanthum* (Anexo I). En total, 67 de estas secuencias (15 de ETS, 19 de ITS, 18 de *trnLF* y 15 de *trnTL*), pertenecientes a 21 poblaciones, fueron generadas para este estudio, mientras que 363 se obtuvieron de la base de datos del Área de Botánica de la Universidad de A Coruña.

Extracción de ADN

En el caso de las muestras secuenciadas dentro de este estudio, el ADN genómico se extrajo a partir de hojas de plantas recogidas en los años 2009 y 2010, y conservadas en gel de sílice en el Área de Botánica de la Universidad de A Coruña. La extracción se llevó a cabo mediante el kit *Plant DNAeasy* de QIAGEN (Quiagen, Duesseldorf, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Previamente, el material vegetal fue pulverizado con un molino de bolas *Mini Beadbeater* (Biospec Products, Dover, Florida, USA). En las muestras procedentes de especies anuales, más delicadas, y con las que contábamos con menos material vegetal, el triturado de las hojas se realizó en un mortero con nitrógeno líquido para evitar un sobrecalentamiento del material, y por tanto una posible degradación del ADN. Las siguientes etapas del proceso consisten en diversas rondas de filtrado y resuspensión del extracto foliar en las que se elimina todo el material celular excepto los ácidos nucleicos. Tras la extracción del ADN, la eficacia del proceso se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. A continuación, el ADN se cuantificó mediante espectrofotometría a través del Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

Amplificación y secuenciación

Para los análisis se han seleccionado 4 regiones diferentes, 2 nucleares (*external transcribed spacer*, ETS; *internal transcribed spacer*, ITS), y 2 cloroplásticas (*trnTL*, *trnLF*).

ETS e ITS son regiones multicopia, no codificantes, con una función conformacional y que se transcriben para originar ARNr que rápidamente es eliminado en el proceso de maduración del ARN. Dada su variabilidad se han utilizado con éxito en muchos estudios filogenéticos de plantas (e. g. Acevedo-Rosas *et al.*, 2004; Clevinger *et al.*, 1999). Las regiones cloroplásticas empleadas son secuencias no codificantes, intrónicas o espaciadoras, que acumulan gran variabilidad aleatoria, y también han sido muy utilizadas en análisis filogenéticos (e. g. Galley & Linder, 2007; Chatrou *et al.*, 2012). El uso de marcadores plastídicos y nucleares permite potencialmente detectar eventos de hibridación entre linajes y resulta especialmente útil en organismos en los que la evolución reticulada es reciente, como es el caso del género *Anthoxanthum*.

El proceso de amplificación de cada una de las regiones se llevó a cabo mediante reacciones de PCR llevadas a cabo en un termociclador MyCycler (Bio-Rad, Hercules, California, USA)

Para realizar la amplificación de ETS se han utilizado los cebadores (RETS-4-F y 18S-R) y el protocolo de Gillespie *et al.* (2009). La mezcla de reacción para cada una de las muestras tiene un volumen de 15 μ l, y está compuesta por: 10 μ l de H₂O; 1,5 μ l de PCR Buffer 10x; 0,9 μ l de MgCl₂ 25mM; 0,3 μ l de solución de dNTPs (10 mM) (Roche, Basilea, Suíza); 0,38 μ l de cada uno de los cebadores (10 μ M); 0,06 μ l de enzima Taq polimerasa (5 U/ μ l; NZYtech, Lisboa, Portugal) y 1,5 μ l de muestra de ADN. El programa de PCR consiste en un paso de desnaturalización del ADN a 95°C durante 1 min, seguido de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización de 45 segundos a 95°C, una fase de anillamiento de 45 segundos a 58°C y una extensión de 90 segundos a 72°C. Finalmente se realizó una extensión adicional de 5 minutos a 72°C.

Para la amplificación de ITS se han utilizado los cebadores (ITS4 y ITS1) y el protocolo de Hsiao *et al.* (1995). La mezcla de reacción para cada una de las muestras tiene un volumen de 15 μ l, y está compuesta por: 10 μ l de H₂O; 1,5 μ l de PCR Buffer 10x; 0,9 μ l de MgCl₂ 25mM; 0,3 μ l de solución de dNTPs (10 mM); 0,38 μ l de cada uno de los

cebadores (10 μM); 0,06 μl de enzima Taq polimerasa (5 U/ μl ; NZYtech, Lisboa, Portugal); y 1,5 μl de muestra de DNA. El programa de PCR consiste en un paso de desnaturalización del ADN a 95°C durante 1 min, seguido de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización de 45 segundos a 95°C, una fase de anillamiento de 45 segundos a 48°C y una extensión de 90 segundos a 72°C. Finalmente se realizó una extensión adicional de 7 minutos a 72°C.

En la amplificación de *trnTL* se han utilizado los cebadores de Taberlet *et al.* (1991) (tabA y tabB), y el protocolo de Galley & Linder (2007). La mezcla para la PCR tiene un volumen final de 25 μl y se ha realizado con: 8,2 μl de H₂O; 2,5 μl de PCR Buffer 10x; 2,5 μl de MgCl₂ 25mM; 0,63 μl de solución de dNTPs (10mM); 1 μl de BSA al 1% (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA); 4 μl cada uno de los cebadores (10 μM); 0,2 μl de enzima Taq polimerasa (5 U/ μl ; NZYtech, Lisboa, Portugal); y 2 μl de muestra de DNA. El programa de PCR consiste en un proceso de *touchdown* PCR, en la que las fases de anillamiento de los dos primeros ciclos son a mayor temperatura para aumentar la especificidad de la reacción, mientras que en el resto de ciclos la temperatura de esta fase se reduce para aumentar la eficacia cuantitativa de la reacción. Los pasos son los siguientes: un primer paso de desnaturalización del ADN a 94°C durante 3 min, seguido de 32 ciclos compuestos por una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, una fase de anillamiento de 1 minuto a 54°C en los dos primeros ciclos, y a 52°C en los siguientes 30 ciclos; y una extensión de 1 minuto a 72°C. Finalmente se realizó una extensión adicional de 7 minutos a 72°C.

Para la amplificación de *trnLF* se han utilizado los cebadores de Taberlet *et al.* (1991) (tabC y tabF), y el protocolo de Torrecilla *et al.* (2003). La mezcla para la PCR tiene un volumen final de 25 μl y se ha preparado con: 13,5 μl de H₂O; 2,5 μl de PCR Buffer 10x; 1,5 μl de MgCl₂ 25mM; 0,5 μl de solución de dNTPs (10mM); 2,5 μl de BSA al 1% (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA); 0,5 μl de cada uno de los cebadores (10 μM); 0,5 μl de enzima Taq polimerasa (5 U/ μl ; NZYtech, Lisboa, Portugal); y 3 μl de muestra de DNA. El programa de PCR consiste en un paso de desnaturalización del ADN a 95°C durante 10 min, seguido de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización de 30 segundos a 95°C, una fase de anillamiento de 30 segundos a 50°C y una extensión de 2 minutos a 72°C. Finalmente se realizó una extensión adicional de 5 minutos a 72°C.

Los resultados de las amplificaciones se comprobaron mediante un gel de agarosa al 1,5%, al que se añade un marcador de peso molecular (Marker VI, NZYTech, Lisboa, Portugal), para verificar que las secuencias obtenidas tienen el tamaño esperado. A continuación las muestras amplificadas se purifican mediante la mezcla de enzimas ExoSap (Affymetrix, Santa Clara, California, USA). La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador 3130xl de Applied Biosystems (Foster City, California, USA) a través de la empresa MacroGen Europe (Amsterdam, Holanda).

Análisis filogenéticos

Las secuencias *forward* y *reverse* fueron ensambladas y editadas usando el programa CodonCode Aligner v. 4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA), el mismo con el que más adelante se alineó todo el conjunto de secuencias para cada región amplificada. Finalmente las secuencias fueron re-alineadas a través del programa MEGA v.6 (Tamura *et al.* 2013), utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), cuyo uso se recomienda para analizar especies próximas entre sí. Con las secuencias obtenidas se construyeron cuatro matrices de datos independientes (una por cada región nucleotídica analizada). La decisión sobre si concatenar o no las distintas regiones se tomó siguiendo el criterio establecido Pirie *et al.*, (2009) (i.e., existencia de diferencias en la topología de los árboles apoyadas por más de un 90% de probabilidad posterior en el análisis Bayesiano). Para realizar la concatenación de las distintas regiones se utilizó el software Mesquite v. 2.75 (Maddison & Maddison 2011).

Se realizaron dos tipos de tests filogenéticos: análisis de máxima parsimonia y análisis Bayesiano, ambos de uso común en estudios evolutivos de plantas (e.g. Vandamme, 2003). En ambos análisis se incluyeron representantes del género *Hierochloë* (L.) P. Beauv., muy próximo evolutivamente a *Anthoxanthum* (Pimentel *et al.* 2013). Como grupos externos se emplearon diversos géneros de gramíneas cuyas secuencias se obtuvieron del GenBank. Los gaps fueron ignorados en todos los análisis.

Los análisis de máxima parsimonia se realizaron empleando el software PAUP v. 4 (Swofford, 2000). Con este método se busca la topología (i.e. ordenación de las muestras en función de su semejanza evolutiva) que requiera un menor número de cambios nucleotídicos. Asimismo, los análisis de parsimonia no requieren el

establecimiento de *priors* (asunciones *a priori* acerca del modo de evolución de la secuencia).

En nuestro análisis se les dio el mismo peso a todos los caracteres del alineamiento. Se realizó una búsqueda heurística con 1000 réplicas aleatorias de secuencia aditiva (*random addition sequence replicates*), utilizando la permutación de ramas tipo TBR (*Tree bisection reconnection*). Asimismo, se empleó el algoritmo *branch and bound* para aumentar la eficacia de las búsquedas. Finalmente, la fiabilidad de los nodos de la topología se estableció mediante la técnica del *bootstrapp* con 1000 réplicas. De este modo cada rama del árbol tendrá un apoyo equivalente al porcentaje de árboles en los que figura el clado generado por ella.

El análisis de inferencia bayesiana se llevó a cabo con el programa MrBayes 3.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2005). El análisis bayesiano estima la probabilidad *a posteriori* de las distintas topologías posibles mediante las cadenas de Markov y Monte Carlo (MCMC). La realización de estos tests requiere el establecimiento de asunciones *a priori* (los *priors*) que resumen las expectativas que se tienen acerca de las secuencias analizadas. En nuestro caso el modelo de evolución se estableció mediante el software MrModelTest 2.3 (Nylander, 2004), que determinó que el modelo más probable es el GTR+I+G. A continuación se realizaron los análisis, cada uno de ellos con 4 cadenas de Markov y 30.000.000 de generaciones, guardando una topología de cada 10000 generaciones. La convergencia de los análisis realizados se comprobó usando el software Tracer v1.6 (Rambaut *et al.* 2012) y mediante la medida *ad hoc* ofrecida por el programa. Finalmente, se construyó un árbol consenso utilizando el mismo software MrBayes 3. Todos los tests se realizaron en el servidor *Cipres Science Gateway* de la Universidad de San Diego (<https://www.phylo.org/portal2/home.action> accedido el día 17-06-2014). Los árboles resultantes de todos los análisis filogenéticos fueron visualizados y editados empleando el programa FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012).

RESULTADOS

En el análisis filogenético se han empleado un total de 430 secuencias: 202 para el análisis de las regiones plastídicas (114 de *trnTL* y 88 de *trnLF*) y 228 para el análisis de las regiones nucleares (103 de ETS y 125 de ITS). Asimismo, del total de secuencias

67 han sido generadas para este estudio (15 de ETS, 19 de ITS, 18 de *trnLF* y 15 de *trnTL*), mientras que las restantes 363 se obtuvieron de la base de datos del Área de Botánica de la Universidad de A Coruña. El tamaño para cada una de los alineamientos generados es el siguiente: 1081 pares de bases para la región *trnLF*; 688 pares de bases para la región *trnTL*; 642 pares de bases para la región ETS; y 697 pares de bases para la región ITS.

Los resultados de los análisis exploratorios realizados con las matrices individuales cloroplásticas (*trnTL* y *trnLF*) y nucleares (ETS y ITS) no mostraron diferencias significativas dentro de cada uno de los genomas, por lo que se decidió concatenar las secuencias y construir dos matrices, una plastídica y otra nuclear siguiendo el criterio de Pirie et al (2009). Sin embargo, si se detectaron diferencias significativas entre las topologías producidas a partir de las matrices cloroplástica y nuclear, por lo que no se concatenaron y se analizaron de manera independiente.

El análisis de Máxima Parsimonia de la región ETS se basó en 132 posiciones parsimoniosamente informativas (25,8%), lo que permitió obtener un árbol filogenético consenso a partir de 79 árboles igualmente parsimoniosos. Estos árboles presentaron un índice de consistencia (CI) de 0,768 y un índice de redundancia (RI) de 0,975. En el análisis de secuencias ITS se obtuvieron: 688 posiciones parsimoniosamente informativas (98,7%), que permitieron obtener un árbol consenso a partir de 14 árboles equivalentes. En este caso tanto el CI (0.353) como el RI (0.584) de los árboles fueron bastante menores. Dentro de las regiones cloroplásticas, para el análisis del *trnTL* se han utilizado 282 posiciones parsimoniosamente informativas (41,0%), generándose un árbol consenso a partir de 79 árboles igualmente parsimoniosos. En este caso el CI es de 0,615, y el RI es de 0,894. Finalmente, para el *trnLF* se han analizado 655 posiciones con información de parsimonia (39,4%) y se ha obtenido el árbol consenso a partir de 100 árboles igualmente parsimoniosos. Estos árboles tienen un CI de 0,899 y un RI de 0,990.

Las topologías obtenidas mediante el criterio de Máxima Parsimonia y la inferencia bayesiana han resultado ser equivalentes, es decir, no presentan diferencias apoyadas estadísticamente. En base a esto se decidió presentar únicamente las topologías bayesianas (Figs. 3, 4), que ofrecen una mayor resolución de los distintos clados.

Los análisis Bayesianos realizados en la matriz plastídica permitieron obtener el árbol representado en la figura 3.

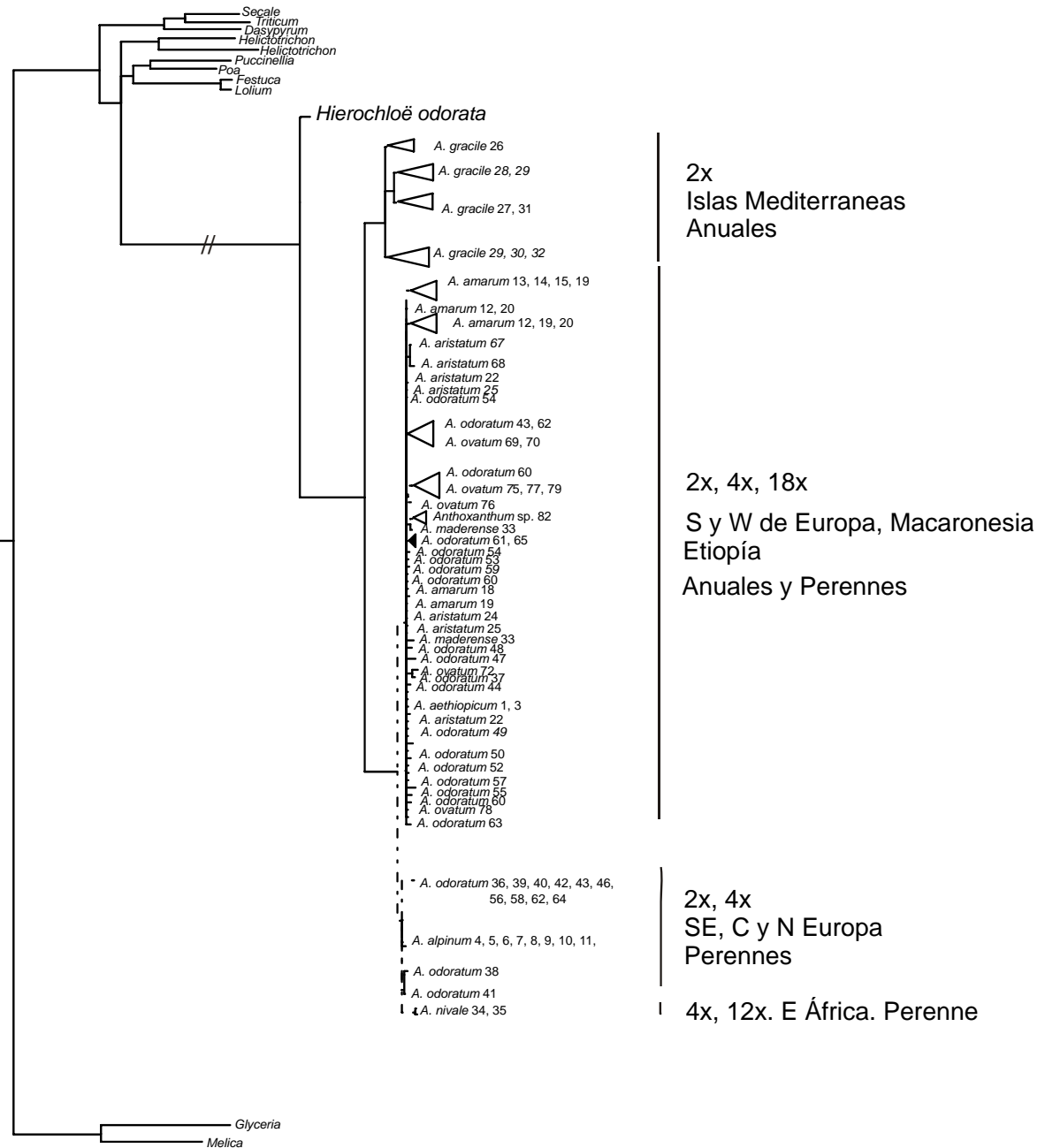


Fig. 3. Árbol consenso obtenido a partir del análisis Bayesiano de 202 secuencias cloroplásticas (*trnTL* y *trnLF*). // representa ramas que han sido cortadas. Las ramas discontinuas representan nodos con un apoyo estadístico menor de 0.8PP

Se observa una separación clara entre los grupos externos (gramíneas de las tribus Meliceae, Brachypodieae, Triticeae y Aveneae/Poeae de la subfamilia Pooideae) y los grupos internos (*Anthoxanthum* y *Hierochloë*). Entre los primeros, las especies

seleccionadas se agrupan según lo esperado de acuerdo con las últimas filogenias publicadas para la F. Poaceae (GPWG, 2011). En los grupos internos se observa una clara separación entre *Anthoxanthum* y *Hierochloë*, que se configuran claramente como taxones hermanos. El árbol obtenido también apoya el carácter claramente monofilético de *Anthoxanthum* (Fig. 3).

La resolución de los distintos grupos dentro del clado de *Anthoxanthum* es baja, con la mayoría de las especies y poblaciones mostrándose como no monofiléticas (Fig. 3). Sin embargo, se observa una diferenciación claramente significativa entre tres clados, uno monoespecífico y dos poliespecíficos (Probabilidad Posterior, 1; 0,61; y 0,58 respectivamente). El primero de estos clados agrupa las poblaciones del taxón *A. gracile*, cuya estructura geográfica se observa en el árbol, aunque no de una forma completa, apareciendo tres clados con buenos apoyos estadísticos dentro de una politomía. El primero de estos clados agrupa a las poblaciones del Mediterráneo Central (Sicilia, Cerdeña y Malta), mientras que el otro incluiría las poblaciones del Mediterráneo Oriental (Creta). De todas formas esta separación no es perfecta, ya que una de las muestras procedentes de Cerdeña (población 29) aparece incluida en el interior del grupo oriental. El tercer clado está constituido por la población 26 (localizada en Malta) que aparece posicionada de forma independiente.

En el siguiente clado estarían el resto de las poblaciones, diferenciándose nuevamente dos grupos: por un lado todas las poblaciones de los táxones anuales (*A. aristatum* y *A. ovatum*), todas las del perenne *A. amarum* y las poblaciones de *A. odoratum* localizadas en la región W y SW del continente europeo (poblaciones 37, 43, 44, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 57, 59, 60, 61, 62, 63 y 65 del Anexo I). Se incluye también dentro de este clado otra de las especies africanas, *A. aethiopicum* y las muestras procedentes de la Macaronesia (*A. maderense* y las formas aún no descritas taxonómicamente procedentes de las Islas Canarias, identificado en el árbol como *Anthoxanthum* sp). La resolución dentro de este clado es muy baja, y apenas se observa estructura. Se aprecia un agrupamiento formado por dos poblaciones de *A. ovatum* de Cerdeña (Poblaciones 67, 68), otro formado por la población de las Islas Canarias junto con una población de *A. maderense* (población 33), pero otras muestras de la misma población se quedan fuera de él. Otra relación con apoyo estadístico relativamente alto es entre la población 37 de *A. odoratum* y la población 72 de *A. ovatum*. El resto de poblaciones presentes en el

clado forman una gran politomía. Los niveles de ploidía que aparecen en este clado son variables, habiendo especies diploides (*A. ovatum*, *A. aristatum* y *A. maderense*), especies tetraploides (*A. aethiopicum* y *A. odoratum*), y especies poliploides (*A. amarum*) que se asocian en los subgrupos mencionados sin que se observe una organización clara. En cuanto a los ciclos de vida también incluye todas las variantes, apareciendo especies perennes (*A. aethiopicum*, *A. amarum*, *A. maderense* y *A. odoratum*), y anuales (*A. aristatum* y *A. ovatum*). El área de distribución de estas especies es mayoritariamente la zona sur y oeste de Europa, incluyendo las Islas Británicas, además de la Macaronesia, y zonas del N de Marruecos.

En el otro gran clado aparecen los taxa *A. alpinum*, *A. nivale*, y algunas poblaciones de *A. odoratum* del centro, norte y sureste de Europa, perteneciendo en muchos casos a regiones montañosas (números 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 46, 56, 58, 62 y 64 del Anexo I). Este clado tiene un apoyo estadístico bajo, y las relaciones entre las especies y poblaciones no son claras, excepto un pequeño clado que incluye las dos poblaciones de la especie africana *A. nivale* (Poblaciones 34 y 35). Todas las especies de este clado poseen un ciclo de vida perenne, y hay variaciones en cuanto a los niveles de ploidía, encontrando especies diploides (*A. alpinum*), especies tetraploides (*A. odoratum*), además de *A. nivale*, que es un complejo poliploide con 2 niveles de ploidía (Hedberg, 1976). En cuanto a la distribución de las muestras de este clado, hay una especie africana, y el resto de poblaciones pertenecen al continente europeo, encontrando muestras de Escandinavia, los Alpes, los Balcanes, República Checa, y una muestra de la Península Ibérica.

Los resultados obtenidos en el árbol basado en la matriz concatenada nuclear, mostrado en la figura 4, son parcialmente coincidentes con lo descrito anteriormente. En este árbol filogenético también se observa una baja resolución, si bien se pueden encontrar clados con cierto apoyo estadístico y, en general una mayor resolución que en el árbol descrito anteriormente.

Se observa una separación clara entre el outgroup (*Helictrotichon*, perteneciente a la tribu Aveneae/Poeae) y el resto de secuencias (*Anthoxanthum* y *Hierochloë*), y también una buena separación entre estos dos géneros hermanos, constituyendo el género *Anthoxanthum* un clado monofilético con un apoyo de 1 (PP).

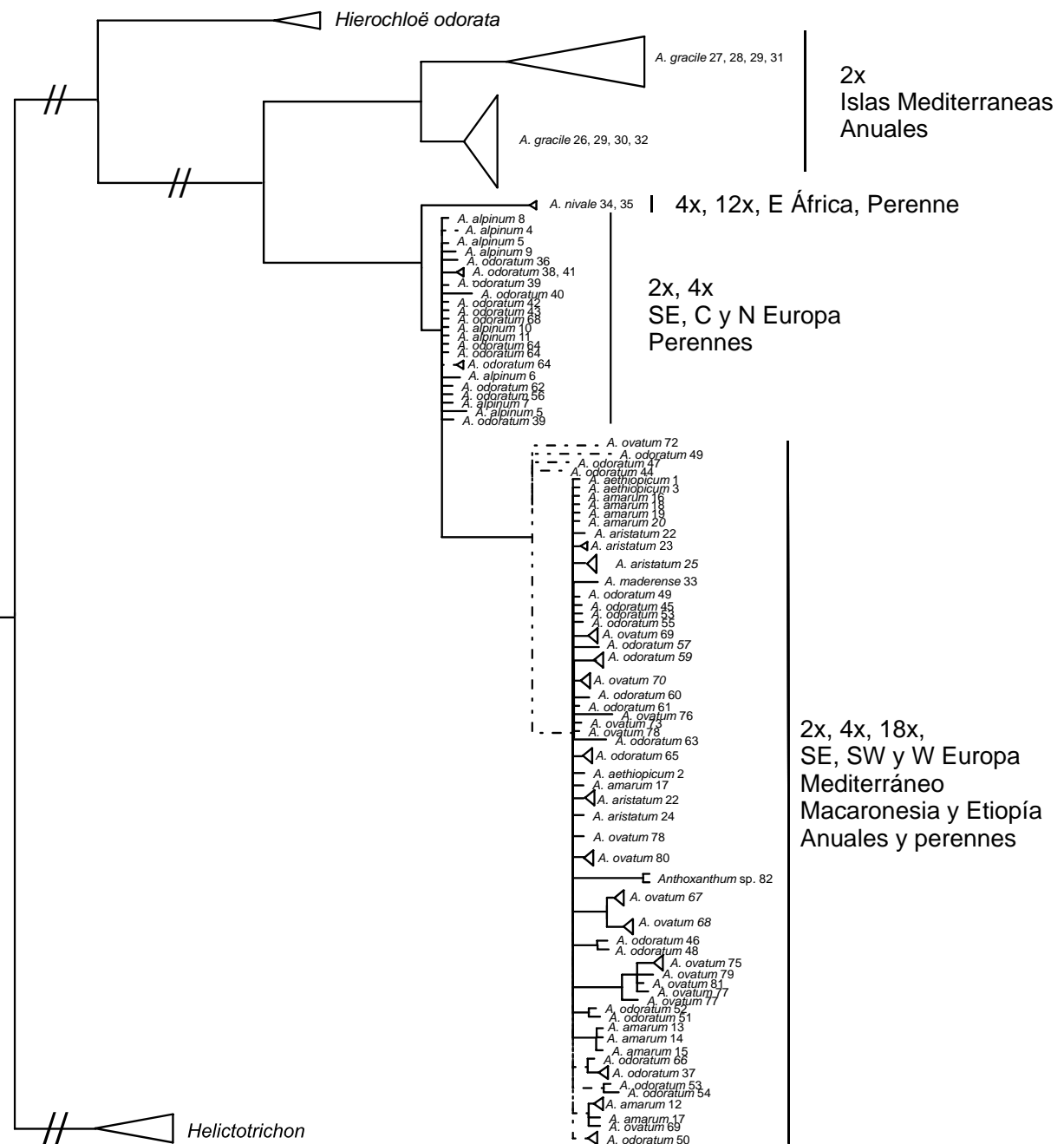


Fig. 4. Árbol consenso obtenido a partir del análisis Bayesiano de 228 secuencias nucleares (*ETS* y *ITS*) que representan 10 especies de *Anthoxanthum*. // representa ramas que han sido cortadas. Las ramas discontinuas representan nodos con un apoyo estadístico menor de 0.8PP

Dentro del género *Anthoxanthum*, se observa una gran división en dos clados, ambos con apoyos de 1 (PP). En uno de los clados se incluyen todas las poblaciones de *A. gracile* con una subdivisión de éstas en dos grupos con buen apoyo estadístico (superiores al 0,9PP). De igual forma que en el árbol de la matriz cloroplástica, aparece un clado en el que se incluyen todas las poblaciones de la región Mediterránea Oriental, localizadas en la isla de Creta, además de uno de los individuos de las poblaciones de la

isla de Cerdeña (población 29 del Anexo I). En el otro clado aparecen las poblaciones de la zona Central del Mediterráneo, incluyendo las poblaciones de Malta y Cerdeña. También se engloba en este clado otro individuo de la población 29.

En el otro gran clado estarían situadas el resto de especies del género *Anthoxanthum*. Se observa una primera separación de *A. nivale* con respecto al resto de las muestras, con un apoyo estadístico de 1 (PP). En la siguiente división todas las muestras de *A. alpinum* junto con todas las muestras de *A. odoratum* de poblaciones del C, E y SE de Europa o bien de zonas de montaña (mismas poblaciones que aparecían junto a *A. alpinum* en el árbol elaborado a partir de la matriz cloroplástica, con la única diferencia de la población 46, del Alto de Piedrafita, que en este árbol aparece integrada en el siguiente clado) formarían una gran politomía. En el interior de esta politomía surge además un gran clado en el que aparecen todas las muestras de *A. ovatum*, *A. amarum*, *A. aristatum*, *A. aethiopicum*, *A. maderense*, además de la población del morfotipo canario, y el resto de poblaciones de *A. odoratum*. Este clado tiene un bajo apoyo. En cuanto a las relaciones en el interior de este clado se observa una clara proximidad entre las poblaciones de *A. ovatum* de Cerdeña. También aparece un clado en el que aparecen las poblaciones de *A. ovatum* del sur de la Península Ibérica y las del norte de África (Marruecos). Otro clado con un buen apoyo es el formado por las poblaciones de *A. odoratum* de Piedrafita y de Cidones (poblaciones 46 y 48 del Anexo I). La distribución de las poblaciones de este clado se da por toda la zona sur de Europa y el Oeste, incluyendo las islas Británicas y Macaronésicas. En cuanto a los niveles de ploidía y los ciclos de vida presentan una alta variabilidad sin que se vean agrupaciones basadas en estos caracteres.

DISCUSIÓN

Las topologías obtenidas a partir del ADN cloroplástico (Fig. 3) y nuclear (Fig. 4) son altamente coherentes, si bien el nivel de resolución de los árboles generados resultó muy bajo, lo que refleja la escasa variabilidad recogida en las secuencias. Esta baja variabilidad puede evidenciar un origen reciente para las distintas especies y formas analizadas, tal y como ha sido detectado en estudios recientes (Pimentel *et al.*, 2013). Asimismo, la capacidad de hibridación de algunas de las especies (Jones, 1964) y la

consiguiente evolución reticulada a niveles taxonómicos bajos contribuyen a difuminar los límites entre las especies (Hörandl *et al.*, 2009).

Ambos análisis señalan claramente la monofilia de *Anthoxanthum* frente a su género hermano *Hierochloë*. Dentro de *Anthoxanthum* se diferencian 3 grupos en la filogenia plastídica (Fig. 3), de los cuales solo uno es monoespecífico y presenta apoyo estadístico elevado. Por otro lado, en la filogenia nuclear se aprecian 4 grupos (Fig. 4) parcialmente coincidentes con los anteriores, dos de ellos monoespecíficos. Así, el clado formado por la especie afroalpina *A. nivale* solo aparece en la filogenia nuclear, mientras que el constituido por el elemento mediterráneo *A. gracile* es apoyado por ambos análisis, que indican que *A. gracile* es la especie con mayor diferenciación con respecto al resto de táxones de la sección, y la única que forma un clado claramente monofilético. Esto es debido a que posiblemente es la que se ha diferenciado con anterioridad, y está bastante aislada geográficamente del resto de especies del género, al habitar solamente algunas islas del Mediterráneo Central y Oriental. Además de esto, los hábitats que ocupa esta especie en esas islas sigue un patrón común. Estas islas están compuestas por terrenos secos, y *A. gracile* aparece en accidentes del terreno donde se acumula una cierta cantidad de humedad (cauces no permanentes, gargantas, etc). Esta característica aporta también una idea de que es una especie antigua, que ha sobrevivido en zonas relictas de las islas al proceso de aridificación de la cuenca mediterránea que ha tenido lugar a lo largo de los últimos 3.2 millones de años (Petit *et al.*, 2005). En cuanto a las relaciones internas de este clado monoespecífico, se aprecia una división en dos subclados con apoyos altos en el árbol nuclear, algo que se hace menos claro en el cloroplástico, ya que en este último análisis se forma una politomía. La diferenciación entre el E y el C del Mediterráneo observada en la topología nuclear (Fig.4) se rompe con una de las poblaciones de Cerdeña (población 29). Esto podría indicar un contacto secundario entre los grupos.

Otro de los clados monoespecíficos en la filogenia nuclear es el formado por la especie de las montañas del Este de África *A. nivale* (Fig. 4), mientras que en el árbol de las secuencias cloroplásticas esta especie aparece en un clado con *A. alpinum* y *A. odoratum*, aunque también forman un grupo con un apoyo claro. Esta relación entre las especies alpinas europeas y las del este de África se debe a la existencia de una ruta de migración para las especies de clima frío europeas a través de Turquía y la Península

Arábica. Esta ruta estuvo activa durante el Pleistoceno debido a las glaciaciones producidas en este periodo y afectó a la distribución de numerosas especies vegetales (e.g. Assefa *et al.* 2007).

Tanto la topología plastídica como la nuclear (Figs. 3 y 4) muestran un clado poliespecífico en el que las relaciones internas no son nada claras. En él aparecen diversas especies con distintos niveles de ploidía de afinidad principalmente mediterránea. Concretamente se incluyen en este clado *A. amarum*, *A. ovatum*, *A. aristatum*, algunas de las poblaciones de *A. odoratum*, *A. maderense*, *A. aethiopicum* y la forma canaria de *Anthoxanthum*, procedente de la isla de La Palma. Las muestras europeas que se incluyen proceden, por lo tanto, de poblaciones de las zonas sur y occidental de Europa, incluyendo las islas Británicas. No se observan relaciones entre las diferentes poblaciones. La situación de *A. aethiopicum* en el interior de este clado es coherente con estudios morfológicos que se han realizado en las especies propias de S de Europa (Pimentel *et al.* 2007). Esta especie no se había incluido en ningún estudio filogenético hasta la fecha. Por otro lado, esta especie está colocada en una posición bastante diferente a la otra especie del este de África, *A. nivale*, lo que parece indicar que la migración de las poblaciones europeas hacia las montañas del este de África se ha producido en más de una ocasión, y a partir de grupos de *Anthoxanthum* diferentes (el origen del género en el E de África es, por lo tanto, polifilético). En este grupo también aparece el poliploide del noroeste Ibérico *A. amarum*, lo que podría indicar que su origen tuvo lugar a partir de un proceso de hibridación entre especies de este clado seguido de varias rondas de poliploidización. Sin embargo, nuestros resultados no nos permiten descartar un origen autopoliploide para esta especie. La situación de las especies de Macaronesia tampoco está clara en los análisis. Mientras que en el análisis cloroplástico (Fig. 3), se muestra una relación entre las poblaciones canarias y las de Madeira con un apoyo alto (a pesar de que no aparecen todas en el clado), en el análisis nuclear (Fig. 4) no se ve esta relación entre las poblaciones de ambos archipiélagos.

El clado formado por las poblaciones de *A. alpinum*, y algunas poblaciones de *A. odoratum*, solo aparece como clado monofilético en el análisis cloroplástico (Fig. 3), mientras que en el análisis nuclear (Fig. 4), sería un clado parafilético en el que se anclaría el grupo comentado anteriormente. Las poblaciones de su interior tienen una distribución en zonas del Norte y Centro de Europa (Alpes, Escandinavia), además de

aparecer en montañas de cierta altitud de zonas del sur de Europa (España, Italia, Balcanes). Además el hecho de que una de las poblaciones de *A. odoratum* (Pob. 46 del Anexo I, Pedrafita), aparezca en clados diferentes en los análisis, podría indicar que la separación entre las poblaciones no es perfecta, o incluso el hecho de que esa población sea un híbrido entre dos poblaciones de los diferentes clados.

En cuanto al origen de los poliploides, los arboles indican que esta no se ha producido en una única ocasión, ya que en los dos grandes clados se ven poblaciones diploides y poblaciones con diferentes niveles de ploidía (tetraploides, dodecaploides, etc.), por lo tanto este proceso de multiplicación del genoma se ha producido en numerosas ocasiones en la historia del género. Especies muy relacionadas morfológicamente, como es el caso de *A. odoratum* y *A. alpinum* aparecen en el mismo clado, sin mostrar una diferenciación clara entre ellas. Además, a esto se le añade que algunas de las poblaciones de *A. odoratum* (tetraploides) aparecen en otro clado diferente a las de *A. alpinum* y el resto de *A. odoratum*, por lo que según esto, *A. odoratum* no sería un taxa monofilético, sino que sería una especie morfológica, formada por más de un linaje (grupo poliploide) originados independientemente. De todas formas, la separación del taxa *A. odoratum* parece seguir un patrón biogeográfico. Las poblaciones del clado de *alpinum-odoratum* pertenecen a regiones con climas más fríos (norte de Europa y zonas de alta montaña del sur de Europa), mientras que las que pertenecen al clado que incluye a las diploides anuales *A. aristatum* y *A. ovatum* están distribuidas por zonas más próximas a la cuenca mediterránea.

En resumen, los resultados obtenidos no han permitido observar las relaciones entre los taxa y poblaciones situados dentro de los clados. Esta dificultad puede deberse, además de a su reciente evolución, a la evolución reticulada propia de muchos grupos vegetales y entre ellos las gramíneas. Esto es, que al haber una baja diferenciación entre las especies, no se crean las barreras suficientes para evitar la fecundación cruzada entre miembros de distintas especies, por lo que se producen hibridaciones que difuminan los límites entre los taxa. Además el hecho de que se produzca una herencia diferente entre el material genético nuclear y el material genético cloroplástico (que solo se hereda por vía materna), hace que las relaciones que se observan entre las poblaciones en cada uno de los genomas, no sean idénticas. De todas maneras, las pequeñas diferencias observadas no permiten detectar la presencia de poblaciones híbridas. Además el hecho

de que se produzca transferencia horizontal de genes (Mason-Gamer, 2004), en procesos como la hibridación, hace que los métodos filogenéticos utilizados no sea el mejor método para continuar el estudio del género, para lo cual se deberían emplear herramientas diferentes, como puede ser el análisis de marcadores moleculares hipervariables (AFLPs).

CONCLUSIONES

1.-En los análisis se observa el origen monofilético de *Anthoxanthum* con respecto a su género hermano *Hierochloë*. Dentro de *Anthoxanthum* hay una clara diferenciación de la especie *A. gracile* con respecto a los otros taxa del género.

2.-El resto de las especies se reparte en dos clados no tan diferenciados. Las poblaciones y especies de la zona sur y oeste del continente, las islas Británicas y Macaronesia (principalmente anuales) forman un clado monofilético, mientras que el resto de poblaciones (centro y norte de Europa y zonas de alta montaña; perennes) formarían otro clado, aunque no tan claro como los anteriores.

3.-La poliploidía se ha originado en diversos momentos de forma independiente en el género. Esto se ve con especial claridad en el taxon *A. odoratum*, tetraploide, que tiene poblaciones tanto en el clado mediterráneo como en el septentrional. Cada uno de los clados anteriormente citados se configura como un complejo poliploide.

4.-En cuanto a las especies de África Oriental, *A. aethiopicum* y *A. nivale*, no tienen una relación monofilética, por lo que la migración del género hacia África se ha producido en más de un evento, y además a partir de clados diferentes. La relación entre estas especies de las montañas del Este de África y las especies europeas es clara, y está relacionada con procesos de migración debido a las glaciaciones producidas en el Pleistoceno.

5.-Para continuar con el estudio de las relaciones filogenéticas y geográficas del género se deberán incorporar al análisis nuevas poblaciones procedentes de otras regiones de su área de distribución. Asimismo, se deberán emplear nuevas técnicas más adecuadas al estudio de la evolución reticulada, tales como los marcadores moleculares hipervariables AFLPs o las técnicas de pirosecuenciación.

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo-Rosas R, Cameron K, Sosa V, Pell S. 2004. A molecular phylogenetic study of Graptopetalum (Crassulaceae) based on ETS, ITS, RPL16, and TRNL-F nucleotide sequences. *American Journal of Botany* **91**: 1099-1104.

Assefa A, Ehrlich D, Taberlet P, Nemomissa S, Brochmann C. 2007. Pleistocene colonization of afro-alpine “sky-lands” by the arctic-alpine *Arabis alpine*. *Heredity* **99**: 133-142.

Clevinger J, Panero JL. 1999. Phylogenetic analysis of Silphium and subtribe Engelmanniinae (Asteraceae: Heliantheae) based on ITS and ETS sequence data. *American Journal of Botany* **87**: 867-872.

Chatrou LW, Pirie MD, Erkens RHJ, Couvreur TLP, Neubig KM, Abbott R, Mols JB, Maas JW, Saunder RMK, Chase MW. 2012. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society* **169**: 5-40.

CodonCode Aligner. CodonCode Corporation. <http://www.codoncode.com>

Davis JI, Soreng RJ. 2007. A Preliminary Phylogenetic Analysis of the Grass Subfamily Pooideae (Poaceae), with Attention to Structural Features of the Plastid and Nuclear Genomes, Including an Intron Loss in GBSSI. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany* **23**: Article 27.

Edgar RC. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792-1797.

Galley CA, Linder HP. 2007. The phylogeny of the *Pentaschitis* clade (Danthonioideae, Poaceae), based on chloroplast DNA, and the evolution and loss of complex characters. *Evolution* **61**: 864-884.

Grass Phylogeny Work Group: Barker NP, Clark LG, Davis JI, Duvall MR, Guala GF, Hsiao C, Kellogg EA, Linder HP. 2001. Phylogeny and subfamilial classification of grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **88**: 373-457.

Gillespie LJ, Soreng RJ, Jacobs SWL. 2009. Phylogenetic relationships of Australian *Poa* (Poaceae: Poinae), including molecular evidence for two new genera, *Saxipoa* and *Sylvipoa*. *Australian Journal of Botany* **22**: 413-436.

Hedberg I. 1976. A cytotaxonomic reconnaissance of tropical African *Anthoxanthum* L. (Graminae). *Botanisk Notiser* **129**: 85-90.

Hedberg I. 1990. Morphological, cytotaxonomic and evolutionary studies in *Anthoxanthum odoratum* L. s.l.- a critical review. *Sommerfeltia*. **11**: 97-107.

Hörandl E. 2009. Geographical Parthenogenesis: Opportunities for Asexuality. *Lost sex*. 161-186.

Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH, Jensen KB. 1995. Molecular phylogeny of the Pooideae (Poaceae) based on nuclear rDNA (ITS) sequences. *Theoretical and Applied Genetics* **90**: 389-398.

Jones K. 1964. Chromosomes and the origin of *Anthoxanthum odoratum* L. *Chromosoma*. **15**: 248-274.

López González G. 1994. Nota sobre el género *Anthoxanthum* L. (Gramineae). *An. Jard. Bot. Madrid*. **51.2**: 309-312.

Maddison, WP, Maddison DR. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75.

Mason-Gamer R. 2004. Reticulate evolution, introgression and intertribal gene capture in an allohexaploid grass. *Systematic Biology*. **53**: 25-37.

Nylander JAA. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala: Uppsala University.

- Petit R, Hampe A, Cheddadi R. 2005.** Climate changes and tree phylogeography in the Mediterranean. *Taxon*. **54**: 877-885.
- Pimentel M, Estévez G, Sahuquillo E. 2007.** European sweet vernal grasses (*Anthoxanthum*, Poaceae; Pooideae; Aveneae): a morphometric taxonomical approach. *Systematic Botany* **32**: 43-59.
- Pimentel M, Sahuquillo E, Catalán P. 2007.** Genetic diversity and spatial correlation patterns unravel the biogeographic history of the European sweet vernal grasses (*Anthoxanthum* L., Poaceae). *Molecular Phylogenetics and evolution* **44**: 667-684.
- Pimentel M, Catalán P, Sahuquillo E. 2010.** Morphological and molecular taxonomy of the annual diploids *Anthoxanthum aristatum* and *A. ovatum* (Poaceae) in the Iberian Peninsula. Evidence of introgression in natural populations. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **164**: 53-71.
- Pimentel M, Sahuquillo E, Torrecilla Z, Popp M, Catalán P, Brochmann C. 2013.** Hybridization and long-distance colonization at different time scales: towards resolution of long-term controversies in the sweet vernal grasses (*Anthoxanthum*). *Annals of Botany* **112**: 1015-1030.
- Pirie MD, Humphreys AM, Barker NP, Linder HP. 2009.** Reticulation, data combination, and inferring evolutionary history: an example from Danthoniidae (Poaceae). *Systematic Biology*. **58**: 612-628.
- Pohl RW. 1972.** New taxa of *Hierochloë*, *Pariana* and *Triplasis* from Costa Rica. *Iowa State Journal of Research* **47**: 71-78.
- Quintanar A, Castroviejo S, Catalán P. 2007.** Phylogeny of the tribe Aveneae (Pooideae, Poaceae) inferred from plastid *trnT-F* and nuclear ITS sequences. *American Journal of Botany*. **94**: 1554-1569.
- Rambaut A. 2012.** FigTree v.1.4.0. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, van der Mark P. 2005.** MrBayes 3.1 Manual. San Diego: University of California at San Diego.
- Schouten Y, Vedkamp JF. 1985.** A revision of *Anthoxanthum* including *Hierchloë* (Graminae) in Malesia and Thailand. *Blumea* **30**: 319-351
- Stapf O. 1898-1900.** *Anthoxanthum*. In: Harvey WH, Sonder OW. Eds. *Flora Capensis*, Vol. 7. Dublin: Hodges, Smith and Co., 465-468.
- Swofford DL. 2000.** PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0. Washington DC: Smithsonian Institution.
- Taberlet P, Gielly G, Pautou G, Bouvet J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**: 1105-1109.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. **30(12)**: 2725-2729.
- Torrecilla P, López-Rodríguez JA, Stancik D, Catalán P. 2003.** Systematics of *Festuca* sects. *Eskia* Willk., *Pseudotropis* Kriv., *Amphigenes* (Janka) Tzvel., *Pseudoscariosa* Kriv. and *Scariosae* Hack. based on analysis of morphological characters and DNA sequences. *Plant Systematics and Evolution* **239**: 113-139.
- Valdés B. 1973.** Revisión de las especies anuales del género *Anthoxanthum* (Graminae). *Lagascalia* **3**: 99-141.
- Vandamme AM, Salemi M, Lemey P. 2003.** The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. Cambridge University Press. Cambridge.

Anexo I: Listado de poblaciones incluidas en el trabajo. Se marcan en rojo las poblaciones a las que se extrajó material genético para este estudio:

A. aethiopicum 1. Etiopía: 50Km N Dolo Mena. 2750m. 2. Etiopía: Above Goba. 3000m. 3. Etiopía: Mt Boruluccu. 3700m.

A. alpinum 4. Francia: Hautes Alpes: Pico Brèvent. 5. Francia: Hautes Alpes: Col de Galibier. 6. Suíza: Valais, Grimselpass. 7. República Checa: Rokytnice: Lovcenka chalet. 8. Suecia: Norrbotten: 10 Km N Björkliden. Vn. 9. Suecia: Dalarna: Nipfjället. 10. República Checa: Hrubý Jeseník Mts., Vysoká Hole Mt. 11. República Checa: Rokytnice: Jehlanka chalet. Vn.

A. amarum 12. España: Galicia: Ferrol: Monte Esperón. 13. Portugal: Guarda: Almeida: Castelo Bom 14. Portugal: Viseu: Caramulo: Cabeço da Neve. 15. Portugal: Aveiro: Águeda: Redonda. 16. España: Asturias: Grandas de Salime: La Coba. 17. España: Asturias: Pesoz: Área recreativa de Pesoz. 18. España: Asturias: Carretera de Taramundi a Teixoes. 19. España: Galicia: Palas de Rei: Castelo de Pambre. 20. España: Galicia: A Coruña: Zas. 21. Portugal: Viseu: Oliveira de Frades: Souto de Lafões.

A. aristatum 22. España: Galicia: Ferrol: San Cristovo. 23. España: Galicia: Palas de Rei: Castelo de Pambre. 24. España: Extremadura: Cáceres: Fuente Tres Cantos, Parque Nacional de Monfragüe. 25. España: Galicia: Baiona: Cabo Silleiro.

A. gracile 26. Malta: Wied Zembaq (prope Birzebugga). 27. Grecia: Creta: Imbros: Garganta de Imbros. 28. Grecia: Creta: Gouverneto: Garganta de Katholiko. 29. Italia: Cerdeña: Lago-Pta Yennarta. 30. Italia: Cerdeña: Orune. 31. Grecia: Creta: Patima: Kournas. 32. Italia: Cerdeña: San Benedetto.

A. maderense 33. Portugal: Madeira

A. nivale 34. Uganda: Ruwenzori: Upper Bigo Bog. 35. Uganda: Virunga Volcanoes: Muhavura

A. odoratum 36. Montenegro: High Dinarics, Durmitor National Park, Zabljak, carretera hacia Savin Kuk. 1800-2200 m.s.m. 37. Serbia: W Balkans, carretera entre Paracim y Zajecar, cerca de Boljeac. Bordes de bosques de Fagus. 38. Bulgaria: N Rhodopians, Sofia, Vitosa Nature Park, Aleko, dirección antenna, 2200 m.s.m. 39. Bulgaria: Parque Nacional Central Balkans, carretera entre Hristo Donovo y Trojan dirección Ostrec Gnezdo Mt.; 1400-1500 m.s.m. 40. Italia: Abruzzo, Apeninos Centrales, Parque Nacional Gran Sasso e Monti della Laga. 2230-2240 m.s.m. 41. Bulgaria: Rhodopians, Pirin National Park, Bangkso, dirección al pico Vihren . 1950-2300 m.s.m. 42. Bulgaria: Rhodopians, Rila National Park, Seven Rila Lakes; 2100-2300 m.s.m. 43. Serbia: W Balcans, camino entre Zarkova y Midzor. 1800-2000 m.s.m. 44. Italia: Tuscany, Alpi Apune, Vinca carretera hacia Capanna Gannerone. 1050 m.s.m. 45. Galicia: Lugo: Folgoso do Courel: Campelo: Vila Elvira. 46. España: Galicia: Lugo: Pedrafita do Cebreiro. 47. Francia: Rhone Alpes: Savoie: La Rosière. 48. España: Castilla-León: Soria: Embalse de la Cuerda del Pozo, Cidones. 49. Portugal: Guarda: Serra da Estrela: Antes de chegar a Famalição. 50. Portugal: Bragança: Parque de Montesinho: Estrada de Rabal a Baçal. 51. España: Galicia: Noia: Fraga de Nimo. 52. España: Asturias: Pesoz: Área recreativa de Pesoz. 53. Irlanda: Wicklow County: Carrigoona. 54. Irlanda: Dublin County: Carrickgollogan. 55. España: Comunidad Valenciana: Castellón: La Pobra de Benifassà: El Boixar. 56. Suecia: Uppsala County: Gamla Uppsala. 57. España: Castilla-León: Salamanca, La Alberca. 58. Francia: Hautes Alpes: Col de Lautaret. 59. Irlanda: Little Sugar Loaf. 60. España: Aragón: Huesca: Benasque: La Renclusa. 61. España: Galicia: Lugo: Sarria. 62. España: Aragón: Teruel: Albarracín: Fuente Buena. 63. España: Galicia: Ourense: Pena Trevinca. 64. República Checa: Moky Dül Valley, meadow 1040 msm. 65. España: Galicia: Folgoso do Courel: Taro Blanco. 66. Suíza: Friburgo: Moleson.

A. ovatum 67. Italia: Cerdeña: Bunia. 68. Italia: Cerdeña: Iglesias: Fluminimaggiore. 69. Grecia: Creta: Imbros: Garganta de Imbros. 70. Grecia: Crete: Omalos Plain. 71. Grecia: Creta: Omalos. 72. España:

Andalucía: Sevilla. **73**. Grecia: Creta: Imbros. **74**. Grecia: Creta: Imbros: Gorxa de Imbros. **75**. Marruecos: Carretera Tanger-Rabat, Boukhalef Sovahel, a 15 Km de Tanger cerca del Clube Tánger TIR. **76**. Marruecos: Carretera Tiflet-Si AifaelBahraoui: Bosque de Mamora. **77**. España: Andalucía: Cádiz: Jerez de la Frontera: Puerto de Gáliz. **78**. España: Madrid: El Paular. **79**. España: Andalucía: Huelva: Parque Nacional de Doñana: El Acebuche. **80**. Montenegro: Lovcen National Park. **81**. España: Andalucía: Huelva: Parque Nacional de Doñana: Laguna de Santa Olalla.

Anthoxanthum sp. **82**. España: Islas Canarias: Santa Cruz de Tenerife: La Palma.