



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

ESTUDIO EVOLUTIVO EN EL ORDEN ALISMATALES

*Estudo evolutivo na orde
Alismatales*



GRADO EN
BIOLOGÍA

CURSO
2013/2014

Alberto Couce Rodríguez
TRABAJO DE FIN DE GRADO
Tutor: Manuel Pimentel Pereira

Contenido

Contenido	2
Resumen.....	3
Resumo.....	3
Introducción	4
Objetivos	10
Materiales y métodos	11
Resultados	16
Discusión.....	23
Conclusiones	27
Bibliografía	28

Resumen

Con el fin de esclarecer las relaciones filogenéticas entre las distintas familias del orden Alismatales, realizamos análisis filogenéticos de parsimonia y Bayesianos de secuencias de las regiones cloroplásticas *matK* y *rbcL* procedentes de las bases de datos del Área de Botánica de la Universidade da Coruña y de GenBank. Asimismo, se realizó una revisión bibliográfica de los fósiles del orden con el objetivo de sentar las bases para futuras dataciones de las divergencias en las Alismatales, lo que permitirá datar su adaptación a los distintos medios que ocupan en la actualidad.

Entre los puntos de mayor interés del análisis filogenético, se incluyen: (i) determinar la posición de las familias Maundiaceae y Tofieldiaceae dentro del orden, así como su relación evolutiva con el resto de las familias y (ii) se observaron evidencias de fenómenos de convergencia adaptativa en el orden, especialmente entre las especies adaptadas a un medio íntegramente marino. La revisión bibliográfica realizada permitió seleccionar los fósiles adecuados para un futuro estudio de datación. Entre los criterios de selección son especialmente importantes la cobertura taxonómica y ecológica de los fósiles, así como una atribución taxonómica clara.

Resumo

Co gallo de esclarecer as relacións filoxenéticas entre as distintas familias da orde Alismatales, realizamos análises de parsimonia e Bayesianos de secuencias das rexións cloroplásticas *matK* e *rbcL* procedentes das bases de datos do Área de botánica da UDC e do GenBank. Así mesmo realizouse unha revisión bibliográfica dos fósiles da orde coa fin de sentar as bases para futuras datacións das diverxencias nas Alismatales, o que permitirá datar a súa adaptación ós distintos medios que ocupan na actualidade.

Entre os puntos de maior interese da análise filoxenética, inclúense: (i) determinar a posición das familias Maundiaceae e Tofieldiaceae dentro da orde, así como a súa relación evolutiva co resto das familias e (ii) observáronse evidencias de fenómenos de converxencia adaptativa na orde, especialmente entre as especies adaptadas a un medio íntegramente mariño. A revisión bibliográfica realizada permitiu seleccionar os fósiles acaídos para un futuro estudo de datación. Entre os criterios de selección son especialmente importantes a cobertura taxonómica e ecolóxica dos fósiles, así como unha atribución taxonómica clara.

Introducción

El orden de las Alismatales incluye plantas acuáticas o semiacuáticas y terrestres de porte herbáceo, con hojas erectas o flotantes por lo general no suculentas, si bien por su enorme diversidad morfológica existen numerosas excepciones a este patrón (Haynes & Holm-Nielsen, 1994).

Las Alismatales constituyen uno de los órdenes mayores dentro de las monocotiledóneas (Clase Liliopsida) y son parcialmente equivalentes a la antigua subclase Alismatidae tal y como fue definida por (Cronquist, 1988). Dentro de la clase Liliopsida, las Alismatales muestran una divergencia temprana y son un grupo hermano a las restantes monocotiledóneas (con la excepción de las Acorales, de divergencia anterior; Givnish *et al.*, 2006; Fig. 1).

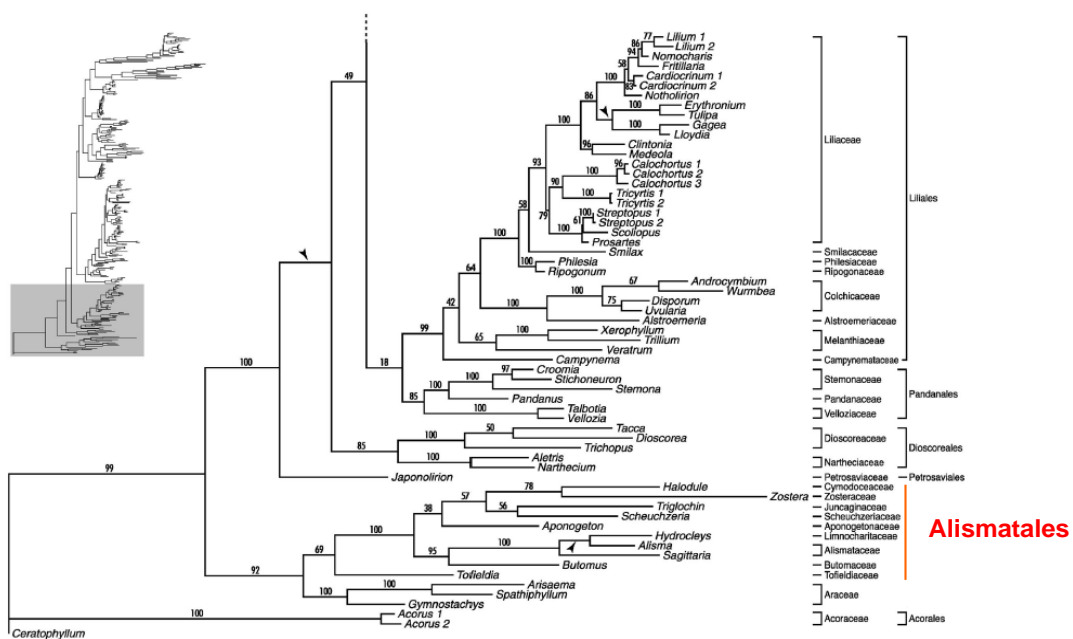


Figura 1.- Posición de las Alismatales en la filogenia de las monocotiledóneas. Tomado de Givnish *et al.* (2006)

El número de taxa incluidos en el orden Alismatales varía según los autores. Las estimaciones más conservadoras apuntan a alrededor de 3320 especies (Stevens, 2001 en adelante), mientras que otros autores elevan esta cifra hasta las 4500 (Magallón & Castillo, 2009). La abundancia y diversidad de este orden en zonas tropicales poco exploradas hace que el número de especies sea probablemente mayor.

El O. Alismatales presenta una distribución cosmopolita (Chen *et al.*, 2004; Haynes & Hellquist, 2000; Fig. 2), si bien está ausente de polos y desiertos y se observa un gradiente de diversidad positivo según nos acercamos a los trópicos (Fig. 2, tomada de www.tropicos.org).

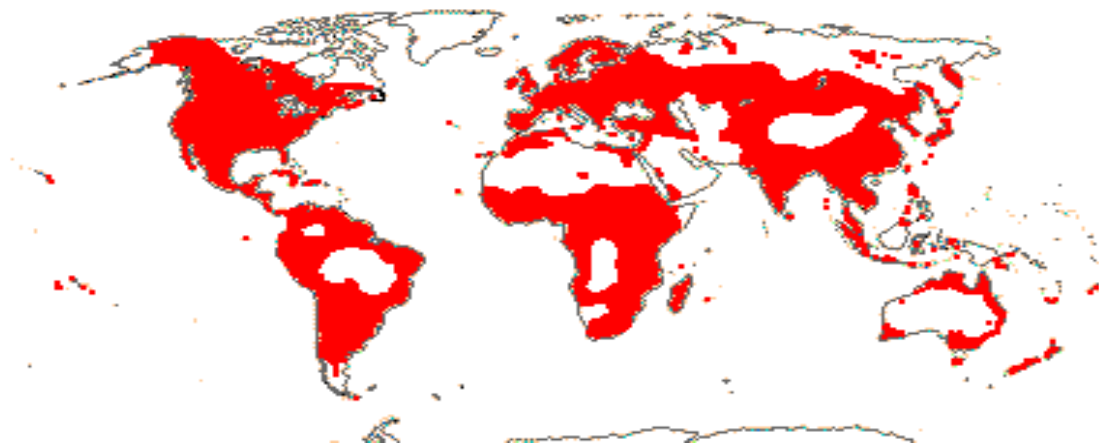


Figura 2.- Distribución mundial del O. Alismatales. Tomado de www.tropicos.org

En lo referido a la ecología del orden, éste ocupa una gran cantidad de hábitats, desde zonas semidesérticas hasta el medio marino. Numerosas Alismatales presentan adaptaciones a una vida acuática o semiacuática, siendo además el único grupo dentro de las plantas superiores que ha conseguido la adaptación a una vida plenamente marina (Coyer *et al.*, 2013).

La gran variabilidad ecológica y morfológica de las Alismatales (Fig. 3) dificulta la definición de sus sinapomorfías (Judd *et al.*, 2008), varias de las cuales estarán basadas en caracteres anatómicos de difícil observación. Así, las más importantes serán la presencia de tricomas glandulares a nivel de los nudos dentro de la base envainadora de la lámina de la hoja; los carpelos con canales completos sin fusionar; los estilos separados; las anteras extrorsas (unidas al filamento por su cara externa); el endosperma helobial y la presencia de un embrión de gran tamaño (Judd *et al.*, 2008; Les & Tippery, 2013).

La estructura taxonómica del orden de las Alismatales es controvertida, y el número de familias incluidas en el orden varía dependiendo de la clasificación seguida (Chase, 2004; Angiosperm Phylogeny Group –APG- III, 2009). Así, tradicionalmente el orden

comprende 12 familias (Stevens, 2001 en adelante), si bien las clasificaciones más recientes (APGIII, 2009) aumentan esta cifra a 14. Los nombres de las familias junto con el número de especies que las componen y su rango de distribución se incluyen en la Tabla 1.



Figura 3.- Algunos representantes del O. Alismatales; *Arum maculatum* L. (superior, izquierda), *Zostera marina* L. (inferior, izquierda), *Alisma plantago-aquatica* L. (superior, derecha) y *Lemna minor* L. (inferior, derecha)

Análisis cladísticos tanto de secuencias de DNA nucleares como cloroplásticas (Chase *et al.*, 2000, 2006; Duvall *et al.*, 1993; Soltis *et al.*, 2000; Hilu *et al.*, 2003) apoyan el origen monofilético de las Alismatales (Fig. 4), como lo hacen las sinapomorfías morfológicas encontradas.

En la filogenia del orden (Fig. 4), se observa la divergencia temprana de dos clados mayores. El primer clado está constituido por la familia Araceae, con diferencia la más diversa dentro del orden (2830 especies propias de medios terrestres) y cuya afinidad al

resto de las Alismatales ha sido descubierta recientemente (Chase, 2004; Les & Tippery, 2013). Este grupo es claramente monofilético y está caracterizado por su estructura floral (Judd *et al.*, 2008). Un segundo clado incluye a las familias tradicionalmente incluidas en la subclase Alismatidae, todas ellas propias de medios acuáticos o semiacuáticos (Simpson, 2006; Fig. 4).

FAMILIAS	NºGÉNEROS Y NºESPECIES	DISTRIBUCIÓN
Araceae	109 géneros, 2.830 especies	Cosmopolita
Alismataceae	15 géneros, 100 especies	Cosmopolita
Aponogetonaceae	1 género, 54 especies	Centro e sur de África, Península de Indochina, Sudeste de Australia
Butomaceae	1 género, 1 especie	Europa, y parte de Rusia
Cymodoceaceae	5 géneros,	Mar Caribe, Costas del norte y centro de África, Costas del Océano Índico
Hydrocharitaceae	20 géneros, 100 especies	Cosmopolita
Maundiaceae	4 géneros	Sudeste de Australia
Posidoniaceae	1 género, 9 especies	Mar Mediterráneo y Costa Sudoeste de Australia
Potamogetonaceae	6 géneros, 100 especies	Cosmopolita
Ruppiceae	1 género, 7 especies	Costas de todo el mundo (Cosmopolita)
Scheuchzeriaceae	1 género, 1 especie	Costas del Hemisferio Norte de Europa y América
Tofieldiaceae	3 géneros,	Costas del Hemisferio Norte de Europa y América
Zosteraceae	2 géneros,	Costas del Hemisferio Norte, Sudeste de África y Sudeste de Australia

Tabla 1.- Familias del O. Alismatales. También se indica su diversidad y su rango de distribución (Judd *et al.*, 2008; Simpson, 2006)

Dentro de las antiguas Alismatidae se distinguen dos clados principales. El primero comprende las familias Alismataceae, Hydrocharitaceae y Butomaceae, y es apoyado por sinapomorfías del perianto, el cual se halla diferenciado en pétalos y sépalos. Tienen más de seis estambres y/o más de tres carpelos, y óvulos dispersos por toda la superficie interna de los lóculos (Dahlgren & Rasmussen, 1983; Cox & Humphries, 1993). La familia Tofieldiaceae aparece como grupo hermano de la familia Araceae sin embargo esta rama está débilmente soportada como se demuestra en estudios recientes (Chase *et al.*, 2000; Les & Tippery, 2013). Las especies de las familias que conforman estos clados, poseen una alta variabilidad en los que al medio que habitan se refiere. Las Alismataceae albergan especies capaces de vivir en medios lacustres, ribereños y terrestres. Por su parte, la mayoría de géneros pertenecientes a las F. Hydrocharitaceae y Butomaceae son plenamente acuáticos y propios de zonas dulceacuícolas especialmente del hemisferio norte.

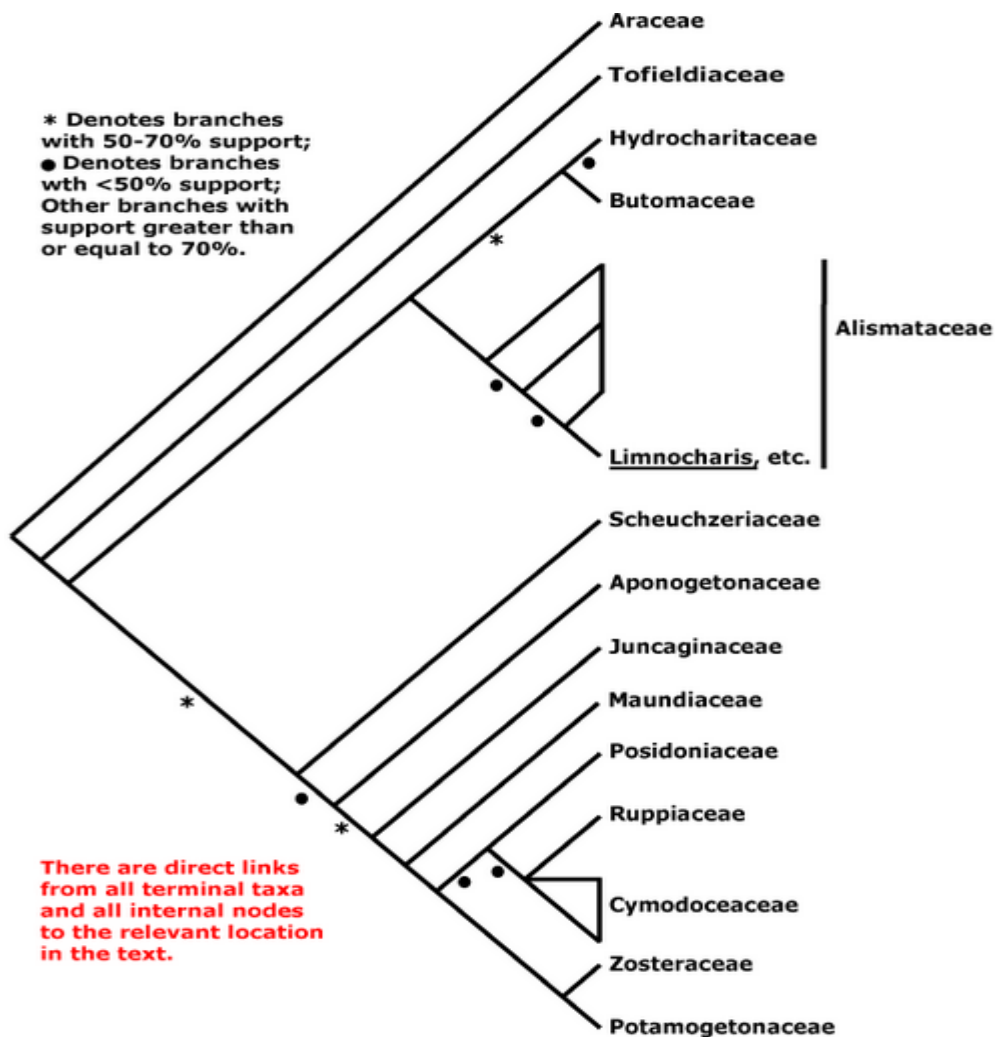


Figura 4.- Estructura filogenética de las Alismatales. Tomado de www.mobot.org

El segundo clado comprende las familias Potamogetonaceae, Ruppiaceae, Zosteraceae, Posidoniaceae, y Cymodoceaceae. Este grupo presenta claras sinapomorfías morfológicas en sus granos de polen, que carece de aperturas y exina (además de estar claramente especializado para su dispersión en un medio acuático (Dahlgren & Rasmussen 1983; Cox & Humphries 1993). La F. Maundiaceae aparece como hermana de las anteriormente mencionadas, aún así, posee un bootstrap insuficientemente alto como para afirmarlo con seguridad.

La estructura taxonómica descrita anteriormente es coherente con lo observado por el APGIII (2009), según el cual se distinguen 4 clados en la filogenia:

- Alismataceae que incluiría Limnocharitaceae.

- Araceae incluyendo Lemnaceae.
- Hydrocharitoides incluyendo a Najadaceae, Hydrocharitaceae y Butomaceae.
- Potamogetonoides incluyendo a Potamogeton y los restantes taxa del orden.

En versiones anteriores de la clasificación del orden publicadas por el APG (APGII, 2003), Tofieldiaceae se incluiría con las Alismataceae en un mismo clado y ambas familias se fusionarían. Otra diferencia entre las clasificaciones será la aceptación o no de la familia Maundiaceae.

Si bien las clasificaciones expuestas anteriormente son las más comúnmente aceptadas, muchos autores no están de acuerdo con las hipótesis publicadas por dos causas principales: (i) el bajo apoyo estadístico de algunos de los grupos en la filogenia y (ii) la divergencia observada entre la filogenia molecular y el análisis morfológico. Así, la posición de la F. Tofieldiaceae obtiene en todos los casos un apoyo moderado (Chase *et al.*, 2000), y en numerosas ocasiones se situó como hermana del resto del orden (Iles *et al.*, 2013) o como hermana de la familia Araceae (Tamura *et al.*, 2004). Sin embargo, Tamura *et al.*, (2004), Janssen & Bremer (2004), Givnish *et al.*, (2006), Chase *et al.*, (2006), Soltis *et al.*, (2011), Nauheimer *et al.*, (2012) y otros han situado a Araceae como hermano de todas las otras Alismatales y a Tofieldiaceae, como hermana del conjunto del orden.

Otro ejemplo de posición filogenética controvertida es la situación de *Maundia* (Ex-Juncaginaceae, actual Maundiaceae APGIII; 2009) cuya posición filogenética recibe siempre un bajo apoyo estadístico. Asimismo, las posiciones de Aponogetonaceae y Scheuchzeriaceae tampoco son del todo precisas (Janssen & Bremer, 2004). Finalmente, la monofilia de las familias Alismataceae, Butomaceae e Hydrocharitaceae está también en discusión (Petersen *et al.*, 2006).

El registro fósil habitualmente representa la única evidencia directa del pasado evolutivo de un linaje (Taylor *et al.*, 2009), y será básico en cualquier estudio sistemático. El uso del registro fósil en el análisis evolutivo requiere un estudio detallado de las sinapomorfías coincidentes entre los taxa actuales y los extintos. Esto se puede ver dificultado por la fragmentación del material fósil y por la muy distinta naturaleza de los fósiles disponibles (e.g. macrofósiles vs microfósiles). Entre los materiales fósiles más comúnmente utilizados están las semillas, el polen, y los restos

de las partes vegetativas de las plantas, aportando estas últimas gran parte de la información necesaria para el estudio sobre la aparición y datación de las sinapomorfías (Stockey *et al.*, 2007).

Las Alismatales, poseen un registro fósil incompleto y mal equilibrado, es decir, no todas las familias están representadas con la misma intensidad (Friis *et al.*, 2000). Familias como las Araceae y Potamogetonaceae están bien representadas, si bien los fósiles de Araceae están mejor conservados y son más numerosos (Friis *et al.*, 2000; Bogner *et al.*, 2005). Por contra, numerosas familias, como por ejemplo Butomaceae y Maundiaceae ni siquiera están representadas en el registro fósil, o no se sabe con seguridad si el fósil encontrado pertenece a dicha familia. El posible uso de los datos del registro fósil del orden Alismatales en análisis de datación molecular requerirá una revisión de la información disponible que permita una selección informada de los fósiles más adecuados.

Objetivos

Este trabajo se encuadra dentro de una línea de investigación más amplia acerca de la evolución del orden Alismatales, especialmente en lo que se refiere a las adaptaciones morfológicas que les permitieron colonizar nuevos hábitats, especialmente acuáticos dulceacuícolas y marinos.

Los objetivos concretos a implementar en este estudio serán:

-Establecer la filogenia del orden Alismatales empleando todas las secuencias de los genes cloroplásticos *matk* y *rbcL* depositadas en la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Asimismo, se emplearán secuencias obtenidas en el laboratorio de flora vascular de la Universidad de A Coruña. Mediante este análisis se pretende resolver las principales controversias en la filogenia del orden.

-Realizar una revisión bibliográfica de los principales fósiles atribuidos al orden Alismatales. Se determinará cuáles son los fósiles más adecuados para datar las distintas divergencias del orden, con vistas a poder realizar una filogenia datada.

Para la consecución de los objetivos planteados en este trabajo se analizará la filogenia del orden empleando dos marcadores cloroplásticos de uso común en estudios

evolutivos de plantas (*matK* y *rbcL*). Asimismo, se revisará la bibliografía más relevante acerca del registro fósil del O. Alismatales.

Materiales y métodos

Obtención de las secuencias

Las secuencias empleadas para la realización de este trabajo se obtuvieron de dos fuentes: (i) muestras de tejido foliar recogidas en la naturaleza u obtenidas mediante compra y (ii) bases de datos públicas. Más concretamente, se emplearon marcadores obtenidos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Las secuencias conseguidas se agruparon en bases de datos independientes para cada una de las moléculas (*matK* y *rbcL*). La matriz del *matK* constaba de 1156 secuencias pertenecientes a 144 géneros de 14 familias de las Alismatales. A su vez, la matriz del *rbcL* incluyó 582 secuencias pertenecientes a 155 géneros de 14 familias de las Alismatales.

Material vegetal

La recolección del material tuvo lugar el día 03/03/14 en diversas zonas del litoral de la provincia de A Coruña. La selección de las especies a recolectar se realizó en base a los registros del Herbario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela (SANT). Asimismo, para aquellas familias no presentes de forma natural en Galicia se compraron ejemplares en tiendas especializadas. En total, mediante recolección (o compra) se obtuvo tejido de 8 especies diferentes, representando un 50% de las familias del O. Alismatales. Las especies recolectadas, así como sus lugares de recolección se incluyen en la tabla 2. El material recogido se guardó en gel de sílice para su mejor conservación.

Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo mediante el kit *Plant DNAeasy* de QIAGEN (Quiagen, Duesseldorf, Alemania), y mediante el kit *NZY Plant/Fungi gDNA* (NZYTech, Lisboa, Portugal) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Previamente, el material vegetal fue pulverizado con un molino de bolas *Mini Beadbeater* (Biospec Products, Dover, Florida, USA). 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, el resultado de la extracción se testó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

ESPECIE	LUGAR DE RECOLECCIÓN	FAMILIA
<i>Arum maculatum</i> Linneo	Lagoa de Valdoviño. Valdoviño	Araceae
<i>Egeria densa</i> Planch	Comercial	Hydrocharitaceae
<i>Alisma plantago-aquatica</i> Linneo	Lagoa de San Martiño. Ortigueira	Alismataceae
<i>Potamogeton</i> sp.	Lagoa de San Martiño. Ortigueira	Potamogetonaceae
<i>Triglochin marítima</i> Linneo	Playa de Mourouzos. Ortigueira	Juncaginaceae
<i>Vallisneria</i> sp.	Comercial	Hydrocharitaceae
<i>Zostera marítima</i> Linneo	Playa de Mourouzos. Ortigueira	Zosteraceae
<i>Zostera noltii</i> Hornemann	Playa de Mourouzos. Ortigueira	Zosteraceae

Tabla 2.-Especies utilizadas durante el proceso de extracción.

Amplificación y secuenciación

Para los análisis se han seleccionado 2 regiones cloroplásticas diferentes, fragmentos de la región 5' de los genes cloroplásticos *matK* y *rbcL*. Dichas regiones presentan alta variabilidad y se han utilizado con éxito en muchos estudios filogenéticos de plantas (e.g. Tamura *et al.*, 2004). Su uso combinado ha sido recomendado en trabajos de filogenia vegetal a niveles taxonómicos altos (Saarela *et al.*, 2013) 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).

En la amplificación de la región *matK* se han utilizado los cebadores flanqueantes 0067F (5'- GATCCTGAAAGGTAATGAATGG-3') y 1198R (5'- CCTTTCCTCCATTTGTTGG-3'), siguiendo el protocolo de Les *et al.* (2008). La mezcla para la PCR tiene un volumen final de 25µl y se ha realizado con: 16,50 µl de

H₂O; 2,5 µl de PCR Buffer 10x; 3 µl de MgCl₂ (25mM); 0,50 µl de solución de dNTPs (10mM); 1,25 µl cada uno de los cebadores (10 µM); 1µl de BSA (1%; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA); 0,25 µl de enzima Taq polimerasa (5 U/µl; NZYtech, Lisboa, Portugal); y 1 µl de muestra de DNA. El programa de PCR consiste en un paso de desnaturalización del ADN a 94°C durante 2 min, seguido de 29 ciclos compuestos por una desnaturalización de 40 segundos a 94°C, una fase de anillamiento de 40 segundos a 52°C y una extensión de 2 minutos a 72°C. Finalmente se realizó una extensión adicional de 10 minutos a 72°C.

Para la amplificación de la región *rbcL* se han utilizado los cebadores flanqueantes 1F (5'-ATGTCACCACAAACAGAAAAGC-3') y 1204-m1 (5'-CCTAAGGGTGTCTAAAGTTTCTCC-3'), siguiendo el protocolo de Les *et al.*, (2008). La mezcla para la PCR tiene un volumen final de 25 µl y se ha preparado con: 16,50 µl de H₂O; 2,5 µl de PCR Buffer 10x; 3,00 µl de MgCl₂ (25mM); 0,5 µl de solución de dNTPs (10mM); 1µl de BSA (1%; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA); 0,25 µl de cada uno de los cebadores (10 µM); 0,25 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 94°C durante 2 min, seguido de 29 ciclos compuestos por una desnaturalización de 40 segundos a 94°C, una fase de anillamiento de 40 segundos a 52°C y una extensión de 2 minutos a 72°C. Finalmente se realizó una extensión adicional de 10 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).

Las secuencias *forward* y *reverse* obtenidas 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 obtenidas para cada región nucleotídica. Finalmente, se construyeron archivos *fasta* para cada uno de los genes secuenciados.

Creación y depuración de las bases de datos

Una vez secuenciadas y aisladas las secuencias de interés, procedimos a la creación de una base de datos ajustada a este proyecto, sobre la que poder realizar los alineamientos y los tests filogenéticos de Parsimonia y Bayesiano. En su confección se emplearon las secuencias extraídas del material recogido en campo y secuencias obtenidas de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Las secuencias fueron guardadas en bases de datos comunes independientemente del origen de las mismas.

En un primer lugar se crearon bases de datos para las distintas familias que componen el orden. Cada una de estas bases de datos parciales se alinearon mediante el algoritmo *Clustal* implementado en el software MEGA v.6 (Tamura *et al.* 2013). Una vez alineadas las secuencias los archivos fueron depurados:

- (i) Se revisó que las secuencias estuvieran orientadas en sentido correcto
- (ii) Se comprobó, mediante el análisis del alineamiento y el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; implementado en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que las secuencias pertenecieran a la especie y a la región nucleotídica de interés.
- (iii) Se eliminaron aquellas secuencias de baja calidad, longitud o que no estuvieran identificadas a nivel específico.

Una vez depuradas las secuencias, se agruparon las de las distintas familias en dos bases de datos (una para cada una de las regiones cloroplásticas). A continuación las secuencias se realinearon mediante el algoritmo *Clustal* y se realizó un nuevo proceso de depuración. Dada la mayor diferenciación de las secuencias entre las distintas familias, el alineamiento debió de ser corregido manualmente. Una vez re-alineadas las secuencias se confeccionaron dos archivos *fasta*, uno para cada región nucleotídica. Las bases de datos finales estaban constituidas por 1328 secuencias (668 matk y 646 rbc1), de las cuales 08 se obtuvieron en el laboratorio del laboratorio de Flora Terrestre de la Universidade da Coruña. Asimismo, 10 secuencias pertenecientes a 10 representantes de los distintos órdenes de las monocotiledóneas se incluyeron como grupos externos para enraizar la filogenia (*Acorus americanus* (Raf.) Raf, Acorales; *Benstonea affinis* (Kurz) Callm. & Buerki, Pandanales; *Curcuma attenuata* Wall., Zingiberales; *Dendrobium* sp.,

Asparagales; *Desmoncus schippii* Burret, Arecales; *Dioscorea polystachya* Turcz, Dioscoreales; *Hanguana pantiensis* Siti Nurfazilah, Mohd Fahmi, Sofiman Othman & P.C. Boyce, Commelinales; *Japonolirion osense* Nakai, Petrosaviales; *Lilium japonicum* Thunb, Liliales; *Oryza officinalis* Wall, Poales).

Análisis filogenéticos

Con las secuencias obtenidas se construyeron dos matrices de datos independientes (una por cada región nucleotídica analizada). Se decidió no concatenar ambas regiones para no ralentizar excesivamente los análisis y para comprobar la coherencia de la señal filogenética de cada una de las regiones.

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). Para el enraizamiento de la filogenia se emplearon 10 secuencias pertenecientes a los distintos órdenes de las monocotiledóneas (listado de secuencias) obtenidas de la base de datos 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*). Además 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.*, 2014) 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).

Revisión del registro fósil para las Alismatales

El conocimiento del registro fósil de los linajes es de gran importancia para la comprensión de su evolución, y es una herramienta muy útil que puede ser empleada en análisis de datación basados en la evolución de las secuencias nucleotídicas (e.g. Christin *et al.*, 2014).

Para la revisión bibliográfica se realizó una búsqueda exhaustiva de información a partir de trabajos paleobotánicos generales (e.g. Taylor *et al.*, 2009) o centrados en la evolución de las plantas con flor (Stockey *et al.*, 2007; Friis *et al.*, 2010). Entre los estudios citados en estas obras, se prestó especial atención a aquellos trabajos que proporcionan datos fiables sobre caracteres morfológicos observados directamente en los fósiles analizados. Asimismo, se prestó especial atención a los macrofósiles no ambiguos pertenecientes a las distintas familias del grupo. Aspectos considerados de especial importancia fueron la datación del fósil, las hipótesis establecidas acerca de la ecología del organismo o la presentación de caracteres sinapomórficos para las distintas familias de las Alismatales.

Resultados

Análisis filogenéticos

Los resultados obtenidos en los análisis Bayesianos y de parsimonia no mostraron diferencias significativas (diferencias en las topologías obtenidas apoyadas por un nivel

de apoyo estadístico *-bootstrap*; BS- superior a 0.9). En el trabajo se mostrarán únicamente los resultados del análisis de parsimonia, que muestran un mayor nivel de apoyo estadístico en los distintos clados. El análisis basado en la región cloroplástica *matK* se basó en una matriz rectangular de 1803 caracteres, de los cuales 647 fueron excluidos y 1156 (64,11%) fueron considerados parsimoniosamente informativos. El índice de consistencia (CI) en el análisis de esta región fue de 0,247, mientras que el índice de retención (RI) fue de 0,888. El análisis de la región *rbcL* se basó en una matriz rectangular de 1504 caracteres de longitud, de los cuales 922 fueron excluidos y 582 (38,69%) fueron considerados parsimoniosamente informativos. En este segundo análisis, el índice CI obtenido fue de 0,238, mientras que el índice RI fue 0,909.

Como resultado de los tests realizados se obtuvieron las topologías mostradas en las Figuras 5 y 6.

Los resultados obtenidos del análisis de la región *matK* (Fig. 5) muestran una clara diferenciación entre los grupos externos o *outgroups* y el grupo interno constituido por las Alismatales y que resulta claramente monofilético. Dentro del grupo interno observamos cuatro clados principales bien diferenciados si bien el análisis no define claramente la relación entre los mismos (a excepción de entre los dos primeros, claramente relacionados):

-Un primer clado compuesto por las familias Zosteraceae, Potamogetonaceae, Cymodoceaceae, Posidoniaceae, Ruppiaceae, Maundiaceae, Juncaginaceae, y Scheuchzeriaceae. El clado integrado por estas familias es claramente monofilético y presenta un fuerte apoyo en todos los análisis realizados (BS, 1). Asimismo, las familias que incluye son monofiléticas y presentan poca diversidad, estando el clado constituido por únicamente 18 géneros. Con respecto a la ecología del grupo, la mayoría de las familias ubicadas en las ramas basales (Scheuchzeriaceae, Maundiaceae y Juncaginaceae) están adaptadas a la vida en zonas húmedas, y presentan un modo de vida anfibio (rizomas para la fijación en el barro, polen adaptado a la dispersión aérea, resistencia a la anoxia en el sustrato etc). Por otro lado tanto Scheuchzeriaceae como Maundiaceae están adaptados a la vida en medios de agua dulce, mientras que las Juncaginaceae están representadas en zonas de alta y baja salinidad. La familia Aponogetonaceae, también incluida en este clado si bien con poco apoyo estadístico, es íntegramente acuática (Judd *et al.*, 2008).

Las familias representadas en las ramas superiores de dicho clado, (Posidoniaceae, Zosteraceae, Cymodoceaceae, Ruppiaceae y Potamogetonaceae son íntegramente acuáticas, habitando las cuatro primeras en el medio marino y Potamogetonaceae en hábitats dulceacuícolas. Estas tres familias inician y completan su ciclo reproductor en el medio acuático y presentan adaptaciones que favorecen la adaptación a estos medios. (e.g. *Potamogeton* posee hojas flotantes y *Posidonia* y *Zostera* producen polen filiforme, que mejora y facilita su dispersión en el medio acuático).

-Un segundo clado, hermano del anterior, constituido por las familias Alismataceae e Hydrocharitaceae. Ambas familias presentan grandes similitudes ecológicas y muestran caracteres morfológicos homólogos. Las familias que conforman este clado poseen una amplia diversidad morfológica entre las especies que las conforman. El nivel de apoyo dentro de este clado es relativamente bajo (inferior al 0,8). Ambas familias conforman grupos monofiléticos. Hydrocharitaceae es una familia íntegramente acuática mientras que existen géneros de Alismataceae que pueden vivir en zonas húmedas del medio terrestre.

-Se observa un tercer clado integrado únicamente por la F. Araceae (Judd *et al.*, 2008), con diferencia la más grande dentro de las Alismatales con 104 géneros y más de 3000 especies. Esta familia se caracteriza principalmente por su estructura floral (Judd *et al.*, 2008). Las flores son pequeñas, con perianto nulo o con 4-8 piezas escamosas. Inflorescencias en espádice (espiga de eje carnoso, rodeada por una espata, que es la que suele ser confundida con el "pétalo" de la flor). Ecológicamente, las Araceae son principalmente terrestres (con notables excepciones, especialmente la Subfam. Lemnoideae, adaptada a la vida acuática). El clado de las Araceae, claramente monofilético, se divide en dos subclados: (i) Un primer subclado compuesto por las subfamilias Aroideae, Zamioculcadoideae, Lemnoideae, Lasioideae, Monsteroideae y Pothoideae y un segundo (ii) subclado, hermano del primero, compuesto por las subfamilias Orontioideae y Gymnostachydoideae que presenta un apoyo estadístico significativamente menor que el grupo anterior.

-Por último se puede observar un cuarto clado, compuesto únicamente por la familia Tofieldiaceae (Fig.5), tradicionalmente considerada próxima a las Araceae, si bien su estructura floral es muy diferente.

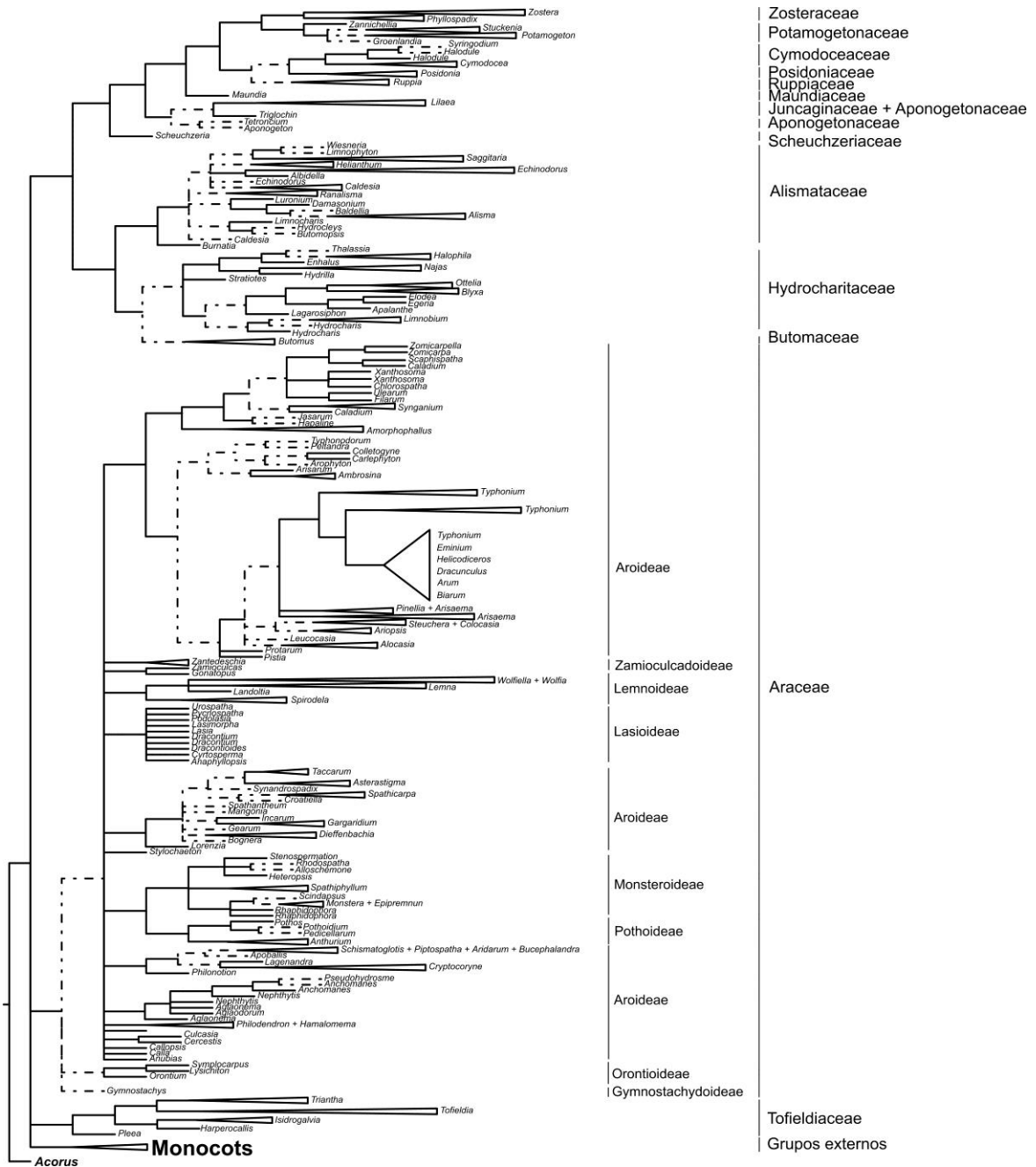


Figura 5.- Topología resultante del análisis de 1803 caracteres de las secuencias cloropásticas de *matK*. Las ramas discontinuas representan nodos con un apoyo estadístico (*bootstrap*, BS) menor de 0.8.

La topología resultante del análisis del gen cloroplástico *rbcL* (Fig. 6) es muy semejante a la observada en el caso anterior, y la mayoría de las variaciones observadas son referidas al nivel de apoyo (más bajo en el *rbcL*) o afectan a clados poco significativos estadísticamente. En este análisis, las Alismatales se disponen en tres clados principales:

-Un primer clado subdividido en dos subclados integrados únicamente por subfamilias de la familia Araceae, ordenados de la siguiente forma:

1.- Un primer grupo compuesto por las subfamilias Aroideae, Zamiculcodoideae, Lasioideae, Monsteroideae, Pothoideae y Lemnoideae. Este grupo muestra, por un lado, una politomía con diferentes niveles de apoyo en cada una de las ramas y que agrupa a las primeras 5 subfamilias antes mencionadas. La subfamilia Lemnoideae aparece como claramente monofilética y diferenciada de las anteriores.

2.- Un segundo grupo, monofilético, también conformado íntegramente por subfamilias de la familia Araceae (Orontioideae y Gymnostachydoideae).

-Un segundo clado claramente dividido en dos grupos monofiléticos:

1.- Un primer grupo incluyendo las familias Alismataceae, Hydrocharitaceae y Butomaceae, con una estructura semejante a la observada en el árbol basado en el *matK*. La principal diferencia en las topologías será la posición de la familia Butomaceae, que en la topología basada en el *matK* es hermana de las Hydrocharitaceae mientras que el *rbcL* la muestra hermana de Hydrocharitaceae + Alismataceae.

2.- Un segundo grupo, hermano del anterior, incluyendo las familias Zosteraceae, Potamogetonaceae, Cymodoceaceae, Posidoniaceae, Ruppiaceae, Maundiaceae, Juncaginaceae, Aponogetonaceae y Scheuchzeriaceae

-Un tercer clado constituido íntegramente por individuos de la familia Tofieldiaceae.

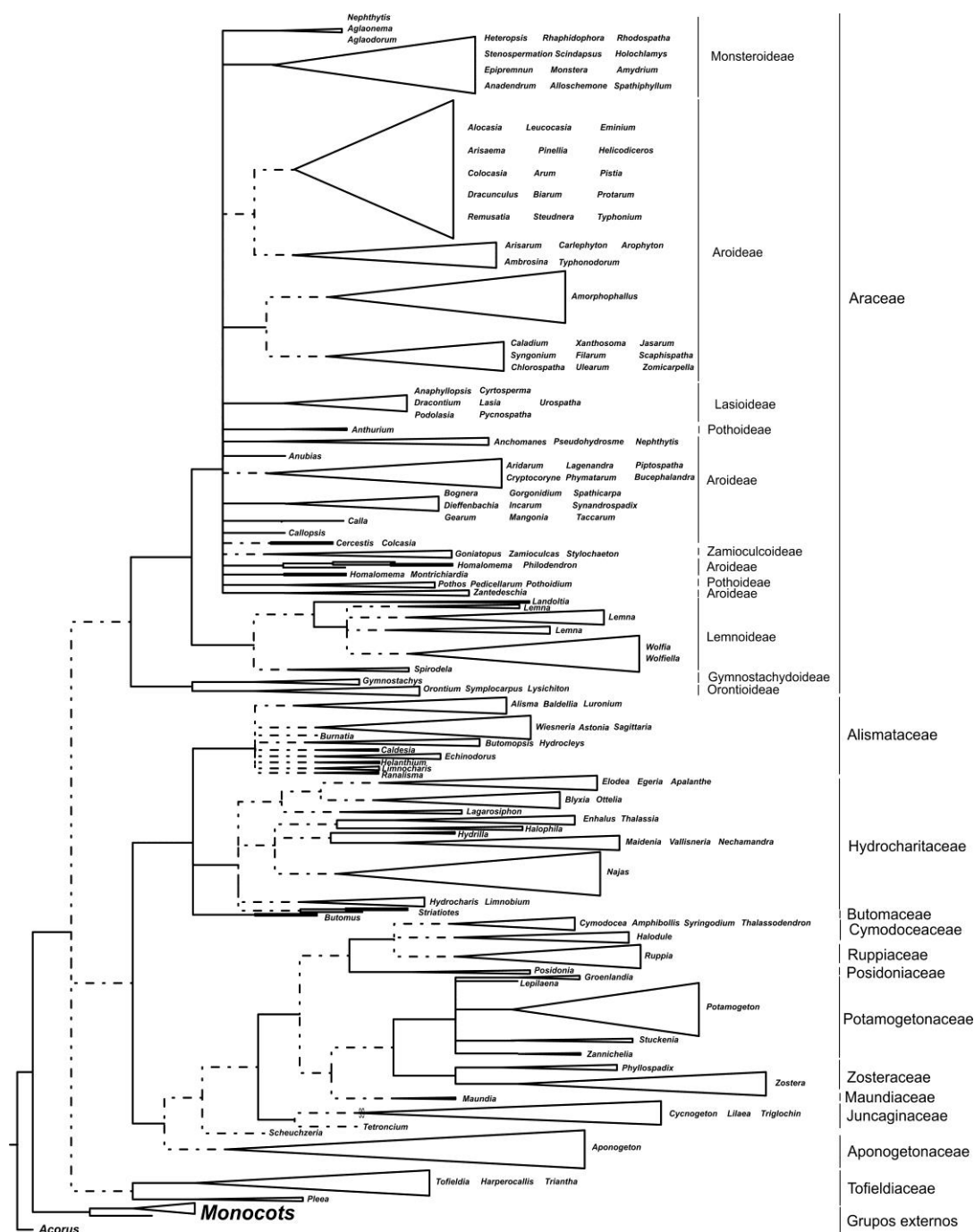


Figura 6.-Topología resultante del análisis de 1504 caracteres de las secuencias cloropásticas de *rbcL*. Las ramas discontinuas representan nodos con un apoyo estadístico menor de 0.8BS

Análisis bibliográfica de los fósiles de las Alismatales

Tras realizar la revisión bibliográfica se decidió que los fósiles más interesantes y útiles para una posible datación de la filogenia eran aquellos que habían sido datados con precisión, y que además poseían alguna característica morfológica o sinapomorfía que permitiese situarlos próximos a una familia perteneciente al O. Alismatales. Los fósiles

encontrados en la bibliografía revisada figuran en la Tabla 3.

FAMILIA O GRUPO	ESPECIE	FUENTE	EDAD	TIPO DE FÓSIL
ARACEAE				
	<i>Keratosperma allebyense</i>	Ceballos-Ferriz & Stockey	Eoceno	
	<i>Proxapertites operculatus</i>	Hesse & Zetter, 2007	Paleoceno-Eoceno	Polen
	<i>Spathiphyllum</i> . Schott	Hesse & Zetter, 2007		Polen
	<i>Limnobiophyllum scutatum</i>	Stockey et al. 1997	Paleoceno -Eoceno	Restos florales,Hojas y Polen
	<i>Limnobiophyllum dentatum</i>	Jarzen,1983	Cretácico tardío	Partes vegetativas
	<i>Limnobiophyllum dentatum</i>	Krassilov et al. 2005	Cretácico tardío	Partes vegetativas
	<i>Mayoa portugallica</i>	Mtchedlishvili & Shakhmoundes 1973	Cretácico temprano	Polen agregado estriado
	<i>Lysichiton</i> . Schott	Kvacek & herman 2004	Campanian temprano	Hojas
	<i>Orontium</i> . Linneo	Bogner et al. 2007	Maastrichian	Hojas
	<i>Symplocarpus</i> . Barton	Bogner et al. 2007	Maastrichian	Hojas
	<i>Rhodospathodendron tomlinsonii</i>	Bonde, 2010	Maastrichian	Hojas
	Tipo <i>pistia</i> *	Stockey 2007	Cretácico tardío	Hojas
	<i>Pennistemon portugallicus</i>	Friis et al. 2000a	Cretácico temprano	Partes vegetativas
	Tipo <i>Proxapertites</i> *	Friis et al. 2004	Cretácico temprano	Polen
	<i>Albertarum puerii</i>	Bogner et al. 2005	Cretácico tardío	Infrescencia
	<i>Acorites heeri</i>	Erwin & Stockey ;1992	Eoceno medio	Partes vegetativas
ALISMATACEAE				
	<i>Heleophyton</i>	Erwin & Stockey ,1989	Eoceno medio	Peciolos fósiles
	<i>Cardstonia tolmanii</i>	Riley & Stockey, 2004	Campanian -Mastrichtian	Hojas
HYDROCHARITOIDES				
	<i>Hydrochariophyllum</i>	Z.Kvacek;1995a	Mioceno temprano	Flores muy modificadas
	<i>Stratiotes</i> . Linneo	Collison, 1983 Mai 1985a Sille et al. 2006	Paleoceno tardío	Flores muy modificadas
POTAMOGETONOIDES				
	<i>Thalassotaenia debeyi</i>	Van der Ham,2007	Cretácico tardío	Hojas lineares
	<i>Archaeozostera</i>	Koriba & Miki,1958	Cretácico tardío	Hojas y Frutos
	<i>Limnocarpus</i>	Collinson, 1982	Paleoceno tardío	Frutos
	<i>Potamogeton</i> (restos)**	Zhilin, 1974	Oligoceno	Varios
	<i>Aponogeton</i> (restos)**	Kovar-Eoler, 1992	Mioceno	Varios

Tabla 3.- Resultado de la documentación bibliográfica sobre fósiles del O. Alismatales.

* Fósiles bien documentados en base a la abundancia, material bien determinado, y material bien representado.

** Restos de diferentes partes de la planta deteriorados debido a efectos tafonómicos.

Discusión

Filogenia de las Alismatales

El análisis preliminar de los resultados de los análisis de parsimonia permite observar que el número y porcentaje de caracteres informativos del gen *matK* es superior al del *rbcL* (64.11% vs 38.69%). Esto es coherente con estudios que recomiendan el uso del marcador *matK* en análisis de filogenia vegetal y, a un nivel más general, como *código de barras* genético. También se aprecia que los valores de los índices de consistencia (CI) y retención (RI) son claramente discordantes. Esto puede deberse a la correlación negativa entre el índice de consistencia y el número de terminales del árbol (Archie, 1989).

Comparando las topologías obtenidas en este estudio (Figs. 5, 6) con las publicadas anteriormente (e.g. Les & Tippery, 2013), no se observan grandes diferencias, si bien el nivel de apoyo estadístico es mayor. Esto puede deberse al mayor número de secuencias empleadas en nuestro estudio con respecto a los anteriores. En lo que se refiere a los puntos conflictivos de la filogenia del orden (i.e. posición de Maundiaceae, apoyo y posición de Tofieldiaceae y posición de Butomaceae) se aprecian pocas diferencias con respecto a las posiciones propuestas más recientemente (Les & Tippery, 2013) con la excepción de la situación de la F. Maundiaceae, claramente apoyada como hermana del clado incluyendo a Posidoniaceae, Zosteraceae, Potamogetonaceae, Cymodoceaceae, y Ruppiaceae. Asimismo, el mayor apoyo obtenido por nuestra filogenia ha permitido confirmar la posición de clados cuya significación en estudios previos era baja (Les & Cleland, 1997; Les & Tippery, 2013). Un ejemplo será el grupo integrado por las familias Zosteraceae, Aponogetonaceae, Potamogetonaceae, Cymodoceaceae, Posidoniaceae, Ruppiaceae, Maundiaceae, Juncaginaceae, y Scheuchzeriaceae (Clado *Zostera*, Figs. 5 y 6) o la F. Tofieldiaceae.

El apoyo mostrado por nuestras filogenias en el interior de los clados es generalmente bajo, si bien es también muy heterogéneo en las distintas familias. Así, por ejemplo, las Araceae presentan siempre una politomía basal. Este problema se podrá resolver parcialmente con la concatenación de las secuencias del *matK* y el *rbcL*.

Los resultados obtenidos permiten observar la influencia de la adaptación a distintos ambientes en la diversidad, así como sirven para detectar casos de convergencia

evolutiva, en muchos casos derivados de la adaptación a un medio acuático, ya sea marino o dulceacuícola (Cox & Humphries, 1993; Les *et al.*, 1997).

Si observamos con más detalle el clado *Zostera*, descrito con anterioridad, vemos que está compuesto por familias y géneros adaptados a diferentes medios. Las primeras familias en bifurcarse de la línea principal son Scheuchzeriaceae, Juncaginaceae y Maundiaceae, todas ellas propias de zonas húmedas (marinas y dulceacuícolas) pero no íntegramente acuáticas y que florecen fuera del agua (Judd *et al.*, 2008).

Las ramas superiores de este clado sostienen a las familias completamente acuáticas, como Posidoniaceae, Zosteraceae, Potamogetonaceae o Cymodoceaceae que, de acuerdo con nuestros resultados, probablemente evolucionaron a partir de antepasados anfibios. Esta posibilidad ya ha sido propuesta por otros autores (Wissler *et al.*, 2011). Es importante señalar que dentro de las Alismatales existen otros taxa adaptados a la vida marina (e.g. *Halophila*, *Najas*; F. Hydrocharitaceae) que son morfológicamente semejantes a algunos de los grupos anteriores, si bien se trata de ejemplos de convergencia evolutiva (Wissler *et al.*, 2011).

Con respecto a los grupos incluidos en el clado *Zostera*, es importante señalar que su diversidad dentro de las Alismatales es baja, lo que puede ser un reflejo de las dificultades que plantea el medio marino (y acuático en general) para la vida de las angiospermas (Crawford, 2008).

Observando el segundo clado descrito (incluyendo las familias Hydrocharitaceae, Alismataceae y Butomaceae; Figs 5 y 6) se aprecia una gran diversidad de hábitats, si bien la mayoría de los taxa son acuáticos o semiacuáticos (Judd *et al.*, 2008), principalmente en ambientes lóticos. Tanto el árbol basado en *matK* como la topología derivada de la matriz *rbcL* señalan la monofilia del clado, apoyando de esta manera la fusión de la antigua familia Limnocharitaceae en las Alismataceae (APG III, 2009). Con respecto a las distintas familias del clado, los genes analizados no permiten conocer sus relaciones evolutivas, lo cual puede ser indicativo de su proximidad, especialmente en el caso de las Hydrocharitaceae y las Butomaceae ((Les & Cleland, 1997). Como se señaló con anterioridad, dentro de este clado existen también taxa plenamente adaptados a la vida marina, lo que supone un segundo episodio de colonización del medio (Wissler *et al.*, 2011).

En lo que respecta a la familia Araceae, es claramente monofilética (Figs. 5 y 6), tal y como también señalan sus claras sinapomorfías florales (Judd *et al.*, 2008), a pesar de las diferencias marcadas en morfología y sistemas reproductivos. Se trata con diferencia de la familia más diversa del orden (104 géneros y alrededor de 3000 especies). Este estudio apoya la inclusión de las antiguas Lemnaceae dentro de las Araceae con nivel de subfamilia (Subfam. Lemnoideae; APG III, 2009). La gran diversidad de la familia ha sido relacionada con su estructura floral, única entre las angiospermas.

Las inflorescencias de Araceae son polinizadas por muchos grupos de insectos, especialmente escarabajos, moscas y abejas. La inflorescencia usualmente produce un fuerte olor y muchas veces también calor. Tanto el calor como el olor desprendidos, forman parte de una estrategia para facilitar la dispersión mediante la acción de los insectos polinizadores antes mencionados. Esto es posiblemente una adaptación al medio, si tenemos en cuenta que en una selva tropical (el hábitat donde las Araceae son más diversas, Judd *et al.*, 2008) la reproducción anemófila se vuelve complicada. Una vez más, la Subf. Lemnoideae es divergente, con sus diásporas dispersadas por el agua (APG II, 2003).

Si bien nuestras topologías no permiten apreciar la estructura interna de las Araceae, podemos decir que nuestro análisis recuperó la mayoría de los clados en que ésta se divide (Cusimano *et al.*, 2011).

Revisión bibliográfica de fósiles.

De los fósiles mencionados en la Tabla 3 se ha realizado una selección basada en los siguientes criterios (Tabla 4): (i) fósil considerado no ambiguo en la literatura especializada; (ii) fósiles no atribuidos a especies o géneros existentes en la actualidad, lo que podría, dada la antigüedad media de los fósiles de las Alismatales, llevar a error en las dataciones; (iii) escoger fósiles procedentes de épocas alejadas a lo largo de la evolución de las Alismatales; (iv) seleccionar fósiles representativos de los distintos modos de vida prevalentes en las Alismatales; terrestres (Araceae), acuáticos y semiacuáticos y (v) maximizar en lo posible el número de familias representadas. Los principales problemas encontrados a la hora de la selección fueron la ausencia de algunas familias del registro fósil y el hecho de que a menudo las estructuras reproductivas, claves para la identificación, no se conservan.

Los fósiles seleccionados, junto con la fuente bibliográfica de la que se han obtenido, figuran en la Tabla 4.

FAMILIA O GRUPO	ESPECIE	FUENTE	EDAD	TIPO DE FÓSIL
ARACEAE				
	<i>Propxapertites operculatus</i>	Hesse & Zetter, 2007	Paleoceno-Eoceno	Polen
	<i>Limnobiophyllum scutatatum</i>	Stockey <i>et al.</i> 1997 Jarzen, 1983	Paleoceno -Eoceno Cretácico tardío	Restos florales,Hojas y Polen
	<i>Limnobiophyllum dentatum</i>	Krassilov <i>et al.</i> 2005	Cretácico tardío	Partes vegetativas
	<i>Mayoa portugallica</i>	Mtchedlishvili & Shakhmoundes 1973	Cretácico temprano	Polen agregado estriado
	<i>Lysichiton</i>	Kvacek & herman 2004	Cretácico tardío	Hojas
	<i>Orontium</i> . Linneo	Bogner <i>et al.</i> 2007	Cretácico tardío	Hojas
	<i>Pennistemon portugallicus</i>	Früs <i>et al.</i> 2000	Cretácico temprano	Partes vegetativas
	<i>Acorites heeri</i>	Erwin & Stockey ;1992	Eoceno medio	Partes vegetativas
ALISMATACEAE				
	<i>Heleophyton</i>	Erwin & Stockey ,1989	Eoceno medio	Peciolos fósiles
	<i>Cardstonia tolmarii</i>	Riley & Stockey, 2004	Cretácico tardío	Hojas
HYDROCHARITOIDES				
	<i>Hydrochariophyllum</i>	Z.Kvacek;1995a	Mioceno temprano	Flores muy modificadas
	<i>Stratiotes</i>	Collison, 1983 Mai 1985a Sille <i>et al.</i> 2006	Paleoceno tardío	Flores muy modificadas
POTAMOGETONOIDES				
	<i>Thalassotaenia debeyi</i>	Van der Ham,2007	Cretácico tardío	Hojas lineares
	<i>Archaeozostera</i>	Koriba & Miki,1958	Cretácico tardío	Hojas y Frutos
	<i>Limnocarpus</i>	Collinson, 1982	Paleoceno tardío	Frutos
	<i>Potamogeton</i> (restos)**	Zhilin, 1974	Oligoceno	Varios
	<i>Aponogeton</i> (restos)**	Kovar-Eoler, 1992	Mioceno	Varios

Tabla 4.- Fósiles recomendados para futuras dataciones filogenéticas del O. Alismatales. (Hydrocharitoides, Hydrocharitaceae + Butomaceae; Potamogetonoides, Clado *Zostera*)

Conclusiones

- Las filogenias obtenidas son coherentes con los resultados de trabajos anteriormente publicados, si bien se consigue un mayor apoyo estadístico.
- La familia Maundiaceae es de origen monofilético y su posición dentro del clado está fuertemente apoyada (*bootstrap* > 0,9).
- La familia Tofieldiaceae consolida su posición con un fuerte apoyo (*bootstrap* > 0,9) como familia independiente en las Alismatales, hermana de la F. Araceae.
- La familia Butomaceae es muy próxima genéticamente al clado de la familia Hydrocharitaceae, si bien no obtenemos un alto valor de apoyo para su posición.
- La colonización del medio marino por parte de las Alismatales ha tenido lugar en diferentes momentos de la evolución, observándose convergencias adaptativas.
- Se han seleccionado fósiles fiables y útiles a la hora de realizar futuras dataciones de la especiación de las distintas familias del orden Alismatales, así como de la aparición de las sinapomorfías características de cada grupo.

Bibliografia

- Angiosperm Phylogeny Group. (2003). An update for the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGII. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141: 399-436.
- Angiosperm Phylogeny Group. (2009). An update for the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGIII. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 161: 105-121.
- Archie, J. W. (1989). Homoplasy excess ratios: new indices for measuring levels of homoplasy in phylogenetic systematics and a critique of the consistency index. *Systematic Biology*. 38(3): 253-269.
- Bogner, J., Hoffman, G. L., & Aulenback, K. R. (2005). A fossilized aroid infrutescence. *Albertarum puerii* gen. nov. et sp.nov., of Late Cretaceous (Late Campanian) age from the Horseshoe Canyon Formation of southern Alberta. Canada. *Canadian Journal of Botany*. 83. 591-598.
- Chase, M. W., Fay, M. F., Devey, D. S., Maurin, O., Rønsted, N., Davies, T. J., ... & Rai, H. S. (2006). Multigene analyses of monocot relationships: a summary. *Aliso*. 22: 63-75.
- Chase, M. W., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Randall, P. J., Fay, M. E., Hahn, W. H., Sullivan, S., Joseph, J., Givnish, T., Sytsma, J. K. & Pires, J. C. (2000). Higher level systematics of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. In K. L. Wilson and D. A. Morrison. [eds.], *Monocots systematics and evolution*. CSIRO, Melbourne, Australia. 3-16.
- Chase, M. W. (2004) Monocot relationships: an overview. *American Journal of Botany*. 91(10): 1645-1655.
- Chase, M. W., Fay, M. F., Devey, D. S., Maurin, O., Rønsted, N., Davies, T. J., ... & Rai, H. S. (2006). Multigene analyses of monocot relationships: a summary. *Aliso*. 22: 63-75.

- Chen J. M., Chen D., Gituru, W. R., Wang, Q-F., Guo, Y. H. (2004). Evolution of apocarpy in Alismatidae using phylogenetic evidence from chloroplast *rbcL* gene sequence data. *Botanical Bulletin Academia Sinica (Taipei)*. 45: 33-40.
- Christin, P. A., Spriggs, E., Colin, P. O., Stromberg, C. A. E., Salamin, N., & Edwards, E. J. (2014). Molecular dating, Evolutionary Rates, and the Age of the Grasses. *Systematic Biology*. 63(2): 123-165.
- Cox, P. A., & Humphries, C. J. (1993). Hydrophilous pollination and breeding system evolution in seagrasses: a phylogenetic approach to the evolutionary ecology of the Cymodoceaceae. *Botanical journal of the Linnean Society*. 113(3): 217-226.
- Coyer, J. A., Hoarau, G., Kuo, J., Tronholm, A., Veldsink, J., & Olsen, J. L. (2013). Phylogeny and temporal divergence of the seagrass family Zosteraceae using one nuclear and three chloroplast loci. *Systematics and Biodiversity* 11(3): 271-284.
- Crawford, R. M. M. (2008). Plants at the margin: Ecological Limits and Climate Change. *Cambridge University Press*. Cambridge.
- Cronquist, A. (1988). The Evolution and classification of flowering plants. 2nd ed. *New York Botanical Garden*. New York.
- Cusimano, N., Sousa, A., & Renner, S. S. (2011). Maximum likelihood inference implies a high, not a low, ancestral haploid chromosome number in Araceae, with a critique of the bias introduced by 'x'. *Annals of botany*. doi: 10.1093/aob/mcr302.
- Dahlgren, R., & Rasmussen, F. N. (1983). *Monocotyledon evolution*. Springer. Amsterdam.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*. 29(8): 1969-1973.
- Duvall, M. R., Clegg, M. T, Chase, M. W., Lark, W. D., Kress, K. J., Hills, H. G., Eguiarte, L. E., Smith, J. E., Gaut, B. S. Zimmer, E. A. & Learn, G. H. (1993). Phylogenetic hypotheses for the monocotyledons constructed from *rbcL* sequences. *Annals of Missouri Botanical Garden*. 80: 607-619.

Friis, E. M., Pedersen, K. R., & Crane, P. R. (2000). Fossil floral structures of a basal angiosperm with monocolpate, reticulate-acolumellate pollen from the Early Cretaceous of Portugal. *Grana*. 39(5): 226-239.

Givnish, T. J., Pires, J. C., Graham, S. W., McPherson, M. A., Prince, L. M., Patterson, T. B., ... & Sytsma, K. J. (2006). Phylogenetic relationships of monocots based on the highly informative plastid gene *ndhF*: evidence for widespread concerted convergence. *Aliso*. 22: 28-51.

Haynes, R. R., & Holm-Nielsen, L. B. (1994). The Alismataceae. *Flora Neotropica*, 1-112.

Haynes, R. R., & Hellquist, C. B. (2000). Alismataceae. *Flora of North America and North of Mexico*. 22: 7-25.

Hilu, K. W., Borsch, T. K., Müller, D. E., Soltis, P. S., Soltis, V., Savolainen, M.W., Chase, M. W. (2003). Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *American Journal of Botany*. 90: 1758-1776.

Iles, W. J. D., Smith, S. Y., Graham, S. W. (2013). A well-supported phylogenetic framework for the monocot order Alismatales reveals multiple losses of the plastid NADH dehydrogenase complex and a strong long-branch effect. In: Wilkin, P. Mayo, S. eds. *Early events in monocot evolution*. Cambridge University Press. Cambridge.

Janssen, T., & Bremer, K. (2004). The age of major monocot groups inferred from 800+ *rbcL* sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 146(4): 385-398.

Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A., Stevens P. F., Donoghue M. J. (2007). *Plant Systematics : A phylogenetic approach*. Sinauer Associates. Sunderland.

Les, D. H., Cleland, M. A., & Waycott, M. (1997). Phylogenetic studies in Alismatidae, II: evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. *Systematic Botany*. 22(3): 443-463.

Les, D. H., & Tippery, N. P. (2013). In time and with water... the systematics of alismatid monocotyledons. *Early events in monocot evolution*. Cambridge University Press. Cambridge.

- Magallón, S., & Castillo, A. (2009). Angiosperm diversification through time. *American Journal of Botany*. 96(1): 349-365.
- Nauheimer, L., Boyce, P. C., & Renner, S. S. (2012). Giant taro and its relatives: A phylogeny of the large genus *Alocasia* (Araceae) sheds light on Miocene floristic exchange in the Malesian region. *Molecular phylogenetics and evolution*. 63: 43-51.
- Nylander, J. A. A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. Uppsala.
- Olsen, J. L., Coyer, J. A., Stam, W. T., Moy, F. E., Christie, H., & Jørgensen, N. M. (2013). Eelgrass *Zostera marina* populations in northern Norwegian fjords are genetically isolated and diverse. *Marine Ecology Progress Series*. 486: 121-132.
- Petersen, G. Seseng, O. Davis, J. I., & Stevenson, D. W. (2006). RNA editing and phylogenetic reconstruction in two monocot mitochondrial genes. *Taxon*. 55: 871-886.
- Rambaut, A. (2012). FigTree v.1.4.0. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D. & Drummond, A. J. (2014). Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., & van der Mark, P. (2005). MrBayes 3.1 Manual.
- Saarela, J. M., Sokoloff, P. C., Gillespie, L. J., Consaul, L. L., Bull, R. D. (2013). DNA Barcoding the Canadian Arctic Flora: Core Plastid Barcodes (rbcL + matK) for 490 Vascular Plant Species. *PLOS One*. 8(10): e77982.
- Simpsons, M. G. (2006). *Plant Systematics*. Elsevier. Amsterdam.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Chase, M. W., Mort, M. E., Albach, D. C., Zanis, M., ... & Farris, J. S. (2000). Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 133(4): 381-461.
- Soltis, D. E., Smith, S. A., Cellinese, N., Wurdack, K. J., Tank, D. C., Brockington, S. F., ... & Soltis, P. S. (2011). Angiosperm phylogeny: 17 genes, 640 taxa. *American Journal of Botany*. 98(4): 704-730.

- Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012. Visitada por última vez 19/07/14. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. (University of Missouri, St Louis).
- Stockey, R. A., Rothwell, G. W., & Johnsons, K. R., (2007). *Cobbania corrugate* gen. et comb. Nov. (Araceae): A floating aquatic monocot from the Upper Cretaceous of western North America. *American Journal of Botany*. 22: 609-624.
- Swofford, D.L. (2000). PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0. Smithsonian Institution. Washington DC.
- Tamura, M. N., Yamashita, J., Fuse, S., & Haraguchi, M. (2004). Molecular phylogeny of monocotyledons inferred from conserved analysis of plastid *matK* and *rbcL* gene sequences. *Journal of Plant Research*. 117: 109-120.
- 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.
- Taylor, T. N., Taylor, E. L., & Krings, M. (2009). *Biology and Evolution of fossil plants*. Elsevier. Amsterdam.
- Vandamme, A. M., Salemi, M., Lemey, P., (2003). *The phylogenetic handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Wissler, L., Codoñer, F. M., Gu, J., Reusch, T. B., Olsen, J. L., Procaccini, G., & Bornberg-Bauer, E. (2011). Back to the sea twice: identifying candidate plant genes for molecular evolution to marine life. *BMC evolutionary biology*. 11(1): 8.
- Wurdack, K. J., Hoffmann, P., Samuel, R., de Bruijn, A., van der Bank, M., & Chase, M. W. (2004). Molecular phylogenetic analysis of Phyllanthaceae (Phyllanthoideae pro parte, Euphorbiaceae sensu lato) using plastid *rbcL* DNA sequences. *American Journal of Botany*. 91(11): 1882-1900.

