



**Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e Ecoloxía
Área de Botánica**

Estudos evolutivos na Orde Alismatales. Datación da filoxenia e evolución morfolóxica.

Estudios evolutivos en el Orden Alismatales. Datación de la filogenia y evolución morfológica.

Evolutionary studies in the Alismatales. Dated phylogeny and morphological evolution.



**Natalia Penas Tizón
Traballo de fin de grao
Data de defensa: 29 de Xuño de 2015**

Dirixido polo Dr. Manuel Pimentel Pereira



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Manuel Pimentel Pereira autoriza a presentación do traballo de fin de grao “**Estudos evolutivos na Orde Alismatales. Datación da filoxenia e evolución morfolóxica**” realizado por Natalia Penas Tizón para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña, a 18 de Xuño de 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Manuel Pimentel Pereira', is written over a faint, light-colored circular stamp or watermark.

Adso. Manuel Pimentel Pereira

CONTIDOS

Introdución.....	1
Aspectos Xerais	1
Distribución, ecoloxía e diversidade das Alismatales.....	2
Estructura taxonómica e filoxenética das Alismatales.....	4
A hidrofilia nas Alismatales.....	4
A filoxenia molecular	5
Obxectivos	7
Materiais e métodos.....	8
Obtención das secuencias	8
Análises filoxenéticas	8
Datación da filoxenia	9
Resultados	11
Análises filoxenéticas	11
Topoloxías obtidas	11
Filoxenias datadas	15
Discusión.....	18
Filoxenia das Alismatales	18
Conclusións/ Conclusions.....	22
Bibliografía.....	23

RESUMO

A Orde Alismatales estivo suxeita a numerosos estudos que pretendían esclarecer a súa filoxenia. Aínda así, as relacións evolutivas entre as familias que a compoñen non deixan de ser incertas.

Preséntase un estudo evolutivo baseado en análises Bayesianas de secuencias das rexións cloroplásticas *matK* e *rbcL* concatenadas, así como da rexión multicopia do ADN ribosomal *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Realízase, asimesmo, unha filoxenia datada que se basea nas mesmas análises Bayesianas e na información proporcionada por diversos fósiles. Esta información permitirá estudar os puntos de diverxencia entre as familias e os procesos de adaptación ós distintos medios que as Alismatales ocupan na actualidade.

Os resultados amosan unha forte congruencia cos estudos anteriores, mais cun apoio estatístico dos nodos notablemente superior. Tamén se confirma a posición filoxenética de certas familias, que ata o momento estaba escurecida. Entre os puntos de maior interese están: (i) determinar a posición das familias Aponogetonaceae, Tofieldiaceae e Butomaceae, ata agora dubidosa e (ii) determinar o ritmo de diversificación da orde, que pode correlacionarse coas transicións ecolóxicas e morfolóxicas dos grupos. Asimesmo, establécense relacións entre a diversificación e as condicións ambientais do periodo no que se producen.

ABSTRACT

The Order Alismatales has been the object of different studies that sought to clarify its phylogeny. However, the evolutionary relationships among several of its families continue to be uncertain.

A new evolutionary study based on the independent Bayesian analysis of two concatenated plastid sequences (*rbcL* and *matK*) and the multicopy ribosomal DNA region *Internal Transcribed Spacer* (ITS) is presented. We also present a dated phylogeny based on the same Bayesian analyses and calibrated using several key fossils. This procedure has allowed us to study diversification times in the order, as well as the adaptation process of the different groups in the order to the environments they occupy nowadays.

The results show strong congruence with previous studies. However, we found significantly higher statistical support for the phylogeny, and the uncertain position of different families has been here confirmed. Some of our most interesting results are: (i) we confirm the phylogenetic positions of families Aponogetonaceae, Butomaceae and Tofieldiaceae, (ii) we relate the diversification of several groups in the order to several ecological and morphological transitions. In addition to this, we have tried to correlate times of diversification in the group with the environmental conditions in which they happened.

INTRODUCCIÓN

Aspectos Xerais

A Orde Alismatales (Cl. Liliopsida) ocupa unha posición basal dentro das monocotiledóneas, sendo irmá das restantes ordes agás das Acorales, que amosan unha diverxencia anterior (Givinish *et al.*, 2006; APG III, 2009; Chase *et al.*, 2006).

Algúns dos caracteres sinapomórficos das Alismatales son a presenza de rizomas e a ausencia de micorrizas (Li & Zhou, 2008), o que pode relacionarse coa forma de vida acuática común nesta orde (Li & Zhou, 2008). Outras sinapomorfías neste grupo serán a presenza de tricomas glandulares a nivel dos nodos na base envainadora da lámina da folla; os carpelos con canles completas sen fusionar; os estilos separados; as anteras extrosas e un endospermo helobial (Judd *et al.*, 2007). Outros caracteres comúns á maioría dos representantes das Alismatales serán o porte herbáceo (Fig. 1) e as follas erectas ou flotantes e xeralmente non suculentas (Haynes & Holm-Nielsen, 1994). Asimesmo, as flores están normalmente agrupadas en inflorescencias e amosan unha gran variabilidade. Finalmente, os embrións das Alismatales adoitan ser clorofílicos (Li & Zhou, 2008).

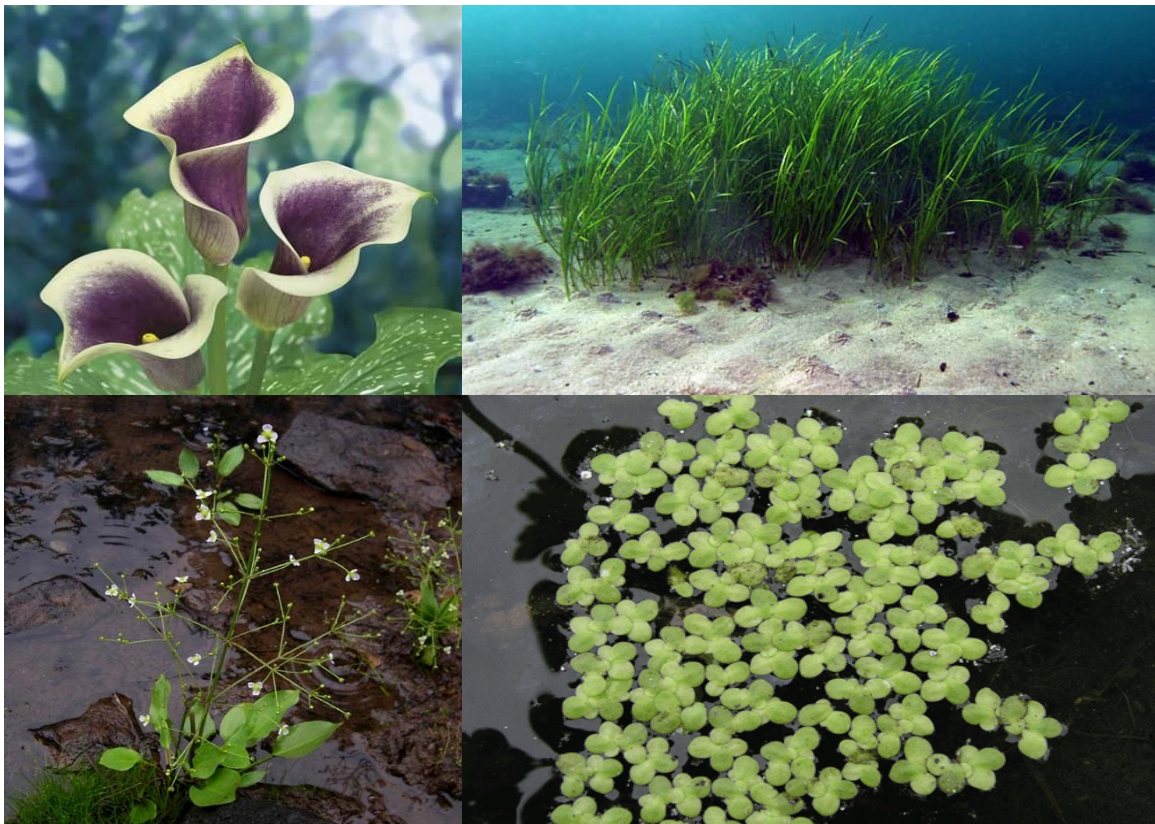


Figura 1. Representantes de diferentes familias da O. Alismatales; *Arum picasso* L. (Araceae; superior, esquerda), *Zostera marina* L. (Zosteraceae; superior, dereita), *Alisma triviale* L. (Alismataceae; inferior, esquerda) e *Lemna minor* L. (Araceae; inferior, dereita).

A antigüidade das Alismatales está suxeita a debate, variando amplamente segundo os autores desde 103 millóns de anos (m.a; Bremer, 2000) ata 146 – 147 m.a (Magallón & Castillo, 2009). Porén, existe consenso en que se trata dunha orde antiga dentro das monocotiledóneas (Friis *et al.*, 2011). Posibles causas da variabilidade existente entre as estimas serán: (i) o baixo número de secuencias analizadas (estudos centrados no conxunto das monocotiledóneas cunha cobertura do 10% ou menor); (ii) métodos de datación non axeitados (Drummond *et al.*, 2012); (iii) escaseza de fósiles de referencia para este grupo ou (iv) baixo tamaño das rexións analizadas.

Distribución, ecoloxía e diversidade das Alismatales

A Orde Alismatales presenta unha distribución cosmopolita (Chen *et al.*, 2004; Iles *et al.*, 2013), estando ausentes unicamente en polos e desertos. Acada a máxima diversidade e abundancia en zonas tropicais (Fig. 2). Ocupa hábitats moi diversos, existindo representantes plenamente terrestres, semiacuáticos ou de zonas pantanosas así como outros adaptados plenamente á vida na auga, en medios continentais e mariños.



Figura 2. Distribución da Orde Alismatales. Tomada de www.tropicos.org

A Orde está constituída por 14 familias e 174 xéneros (2003; Judd *et al.*, 2007; Táboa 1) que inclúen arredor de 4500 especies (Magallón & Castillo, 2009), sendo a cuarta orde en diversidade das monocotiledóneas, tras as Asparagales, Poales e Liliales (Chase *et al.*, 2006).

A familia Araceae é a máis grande e diversa das Alismatales, e claramente monofilética. Conta con 109 xéneros e unhas 3.000 especies. Esta familia divídese á súa vez en subfamilias que presentan unha ecoloxía variable, desde plenamente terrestres (Gymnostachyoideae, Photoideae, Lasioideae e Calloideae) ata completamente acuáticas doceacuícolas (Lemnoideae), pasando por grupos nos que existen representantes de ambos ambientes (Aroideae, Philodendroideae, Orontioideae e Schimatoglotidoideae).

No canto ás restantes familias da orde, atópase unha gran diversidade ecolóxica. Así, a familia Tofieldiaceae é completamente terrestre, namentres que as Juncaginaceae, Maundiaceae, Alismataceae e Ruppiaceae contan con representantes ben doceacuícolas ou ben helofíticos, de augas doces ou mariñas. Pola súa banda, a familia Hydrocharitaceae é doceacuícola, presentando unicamente tres excepcións: os xéneros *Enhalus*, *Halophila* e *Thalassia*, integramente mariños. Finalmente, as familias Butomaceae, Aponogetonaceae, Potamogetonaceae e Scheuchzeraceae son totalmente doceacuícolas e as familias Zosteraceae, Posidoneaceae e Cymodoceaceae son mariñas na súa totalidade. As distintas familias, a súa diversidade xenérica e a súa distribución resúmense na Táboa 1.

FAMILIA	Nº XÉNEROS	DISTRIBUCIÓN
Araceae	109 xéneros	Cosmopolita
Tofieldiaceae	4 xéneros	Eurasia e América
Alismataceae	15 xéneros	Cosmopolita
Hydrocharitaceae	20 xéneros	Cosmopolita
Butomaceae	1 xénero	Eurasia Occidental
Aponogetonaceae	1 xénero	Centro e S de África, SE Asia, S de Australia
Cymodoceaceae	5 xéneros	Mar Caribe, Costas do norte e centro de África, Costas do Océano Índico
Ruppiaceae	1 xénero	Cosmopolita
Posidoneaceae	1 xénero	Mar Mediterráneo e SW de Australia
Potamogetonaceae	6 xéneros	Cosmopolita
Zosteraceae	2 xéneros	Costas do Hemisferio Norte, SE de África e SE de Australia
Maundiaceae	4 xéneros	SE de Australia
Juncaginaceae	4 xéneros	Cosmopolita
Scheuchzeraceae	1 xénero	Costas do N de Europa e América do N

Táboa 1. Familias da O. Alismatales, indicando a súa diversidade e a súa distribución.

En relación ó metabolismo, dominan as plantas C3 malia a distribución primeiramente tropical da maioría dos grupos da orde. Unicamente hai dúas excepción, especies que presentan metabolismo C4 facultativo: *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle e *Egeria densa* Planch. Ambas pertencen á familia Hydrocharitaceae, se ben non están estreitamente relacionadas dentro desta, o que reflectiría dúas orixes independentes deste metabolismo nas Alismatales (Roalson, 2011).

Estrutura taxonómica e filoxenética das Alismatales

As filoxenias máis recentes (Les & Tippery, 2013; Couce, 2014; Fig. 3) amosan unha diferenciación estatisticamente significativa entre os grupos externos (ordes das monocotiledóneas) e as Alismatales, que son claramente monofiléticas. Asimesmo, tamén se observa unha clara monofilia das distintas familias da orde.

Na filoxenia recóbranse catro clados principais: (i) un primeiro clado claramente monofilético composto polas familias Aponogetonaceae, Zosteraceae, Potamogetonaceae, Cymodoceaceae, Posidoneaceae, Ruppiaceae, Maundiaceae, Juncaginaceae e Scheuchzeriaceae; (ii) un segundo clado, irmán do anterior, constituído polas familias Alismataceae, Hydrocharitaceae e Butomaceae, que presentan grandes similitudes ecolóxicas. (iii) Unha terceira linaxe integrada unicamente pola familia Araceae, claramente monofilética. Neste clado, se ben as subfamilias son monofiléticas, as relacións evolutivas entre elas non aparecen ben definidas. Finalmente (iv), a cuarta linaxe está composta unicamente pola familia Tofieldiaceae, e atópase próxima ás Araceae malia as grandes diferencias con respecto á estrutura floral (Judd *et al.*, 2007).

As filoxenias citadas anteriormente, que son as máis completas realizadas ata hoxe, presentan diversas limitacións. En primeiro lugar, están baseadas en xenes individuais pertencentes a un único xenoma celular (o do cloroplasto). Asimesmo, estes estudos filoxenéticos empregaron unicamente a máxima parsimonia, sen comprobar os resultados doutros métodos de inferencia filoxenética. Estas limitacións van influir no apoio á topoloxía obtida. Así, obtense un baixo apoio estatístico para algunhas das familias da orde (e.g. Butomaceae, Aponogetonaceae, Juncaginaceae). Asimesmo, a relación entre a F. Araceae (e as subfamilias dentro dela), a F. Tofieldiaceae e o clado que inclúe as restantes familias do grupo está escurecida por unha politomía (Fig. 3).

A hidrofília nas Alismatales

Das 300.000 especies de anxiospermas que se estima que existen, as hidrófitas representan un 0,04% do total, namentres que as adaptadas especificamente a ambientes mariños non chegan ó 0.02% (Les *et al.*, 1997). Dentro das monocotiledóneas, a maioría das plantas de medios doceacuícolas (e a totalidade das mariñas) pertencen á orde Alismatales (Li & Zhou, 2008).

A adaptación a unha vida acuática conleva a adquisición de numerosos mecanismos de adaptación, á falla de osíxeno e luz dispoñibles e/ou a resistir (e pechar o ciclo reprodutivo) nun medio de alta enerxía e mobilidade (polo propio movemento da auga ou pola inestabilidade do substrato). Algúns dos caracteres que permiten esta adaptación son: follas flotantes (e.g. *Potamogeton*), pole filiforme que facilita a dispersión neste medio (e.g. *Posidonia* e *Zostera*) ou mecanismos de polinización como a hipohidrofília (dispersión somerxida) e a epihidrofília (pola superficie da auga), por exemplo en Cymodoceaceae, Posidoneaceae e algunhas Hydrocharitaceae (e.g. Crawford, 2008).

As numerosas adaptacións necesarias para sobrevivir nun ambiente acuático suxiren a orixe monofilética das Alismatales (Les *et al.*, 1997). Porén, os fenómenos de converxencia evolutiva a miúdo escurecen as orixes independentes de caracteres e grupos. As filoxenias moleculares son a ferramenta principal para resolver estas cuestións (Lemey *et al.*, 2009).

A filoxenia molecular

As filoxenias poden basearse en datos morfolóxicos, nas secuencias de aminoácidos ou nas secuencias de nucleótidos (ou en calqueira outro carácter reducible a unidades discretas). De todas estas aproximacións, a última adoita considerarse a máis axeitada para taxa non extintos, pola maior *simplicidade* destes caracteres nucleotídicos (Lemey *et al.*, 2009).

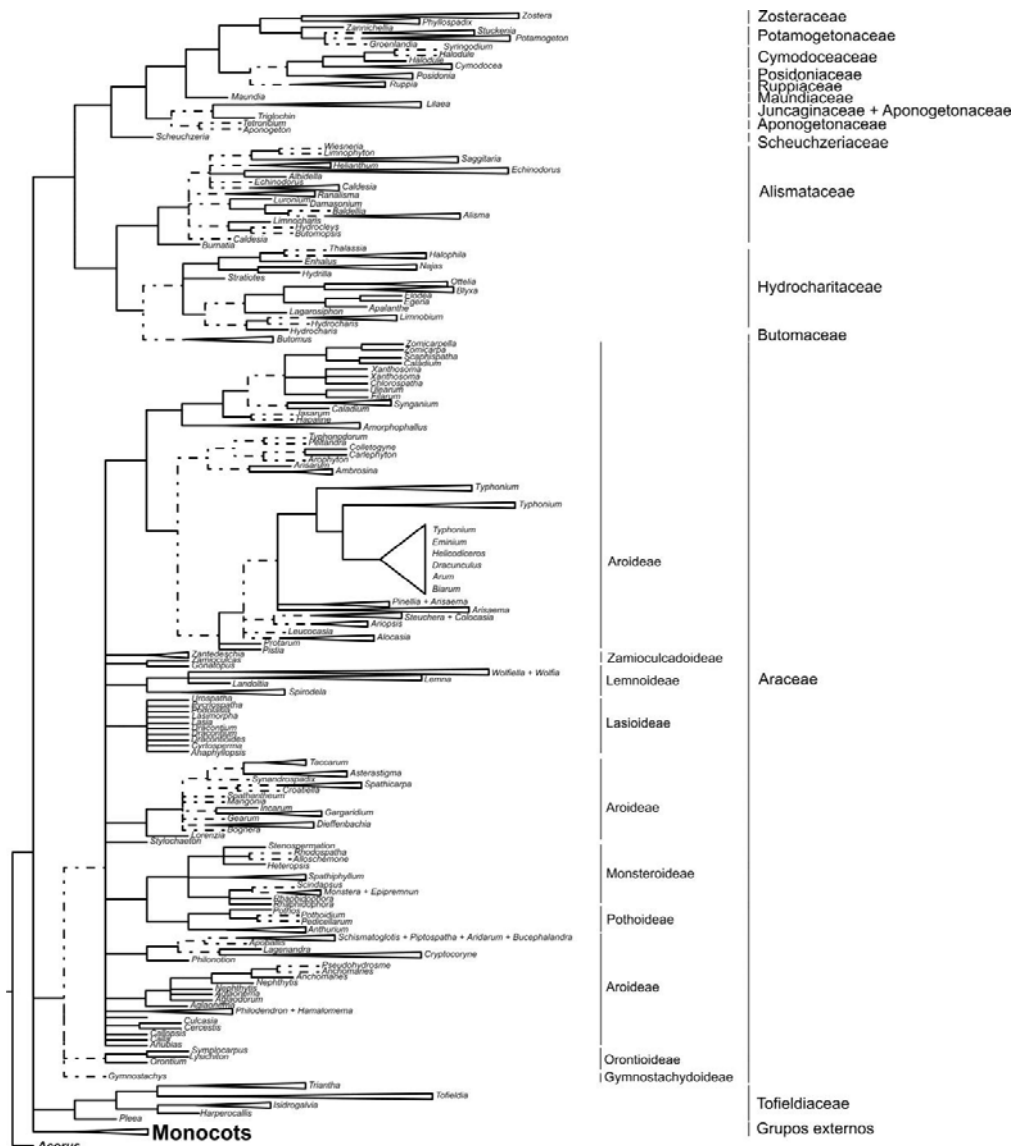


Figura 3. Topoloxía resultante da análise de 1803 caracteres das secuencias cloropásticas de *matK*. As pólas discontinuas amosan nodos cun apoio estatístico (*bootstrap*, BS) menor de 0.8. Tomada de Couce (2014).

A comparación de filoxenias obtidas a partir do xenoma cloroplástico e do nuclear considérase a aproximación máis acaída para analizar a evolución dos grupos vexetais, nos que a transferencia horizontal de xenes é común (e.g. Pimentel *et al.*, 2013). As rexións cloroplásticas *matK* e *rbcL* resultan especialmente axeitadas para estes estudos (e.g. Janssen & Bremer, 2004; Chase *et al.*, 2006) pola súa alta variabilidade no contexto do cloroplasto. Asimesmo, están moi representadas nas bases de datos públicas.

Con respecto ó xenoma nuclear, a rexión multicopia do ADN ribosomal *Internal Transcribed Spacer* [ITS; incluíndo as rexións ITS1, ITS2, 5.8S, 18S (parcial) e 28S (parcial)] ten sido moi empregada en estudos filoxenéticos (Coyer *et al.*, 2013, Sage *et al.*, 2011) a pesar de certas desvantaxes (recombinación, posible existencia de copias diverxentes en taxa poliploides; Álvarez & Wendel, 2003). Asimesmo, é tamén unha secuencia abundante nas bases de datos públicas.

OBXECTIVOS

O principal obxectivo do presente traballo é contribuír a mellorar a comprensión da filoxenia da orde Alismatales, o que será importante para entender a historia evolutiva temperá das monocotiledóneas (Iles *et al.*, 2013). Plantexámonos os seguintes obxectivos concretos:

- 1.- Resolver, mediante unha análise filoxenética baseada en secuencias nucleares e cloroplásticas, as relacións entre os distintos grupos das Alismatales para os cales as anteriores filoxenias non recobraron un bo apoio estatístico.
- 2.- Datar a filoxenia para averiguar cando tiveron lugar as diverxencias dentro da orde.
- 3.- Correlacionar estas diverxencias con cambios morfolóxicos e ecolóxicos nas familias da orde.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtención das secuencias

As análises filoxenéticas realizadas no marco deste estudo baseáronse en tres matrices de secuencias correspondentes ós xenes cloroplásticos *matK* (675 secuencias pertencentes a 173 xéneros das 14 familias das Alismatales) e *rbcL* (723 secuencias pertencentes a 173 xéneros das 14 familias das Alismatales) e á rexión multicopia do ADN ribosomal *Internal Transcribed Spacer* (ITS; 75 xéneros das 14 familias das Alismatales). En cada unha das matrices incluíronse 10 secuencias de 10 representantes de distintas ordes das monocotiledóneas para o enraizamento da filoxenia: *Acorus americanus* (Raf.) Raf, Acorales; *Benstonea affinis* (Kurz) Callm. & Buerki, Pandanales; *Curcuma attenuata* Wall., Zingiberales; *Dendrobium* sp., 15 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.

As bases de datos empregadas foron confeccionadas por Couce (2014) a partir de secuencias obtidas do ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), como parte da realización do seu Traballo de Fin de Grao na Área de Botánica da Universidade da Coruña. Estas bases de datos inclúen representantes de todas as familias da orde Alismatales recoñecidas nos tratamentos taxonómicos máis recentes (e.g. Chase *et al.*, 2006; Les & Tippery, 2013).

Análises filoxenéticas

As bases de datos descritas foron aliñadas empregando o algoritmo ClustalW tal e como está implementado nos programas MEGA v. 6.0.6 (Tamura *et al.*, 2013) e SeaView v.4 (Gouy *et al.*, 2010). Realizouse unha depuración das bases de datos, eliminando as mostras que non se aliñaban correctamente. As matrices cloroplásticas dos xenes *matK* e *rbcL* foron analizadas independente e conxuntamente. A concatenación realizouse co software Mesquite v. 2.75 (Maddison & Maddison, 2009). A decisión de concatenar as secuencias tomouse ó non observar diferenzas significativas entre os resultados baseados en cada unha das rexións cloroplásticas (Couce, 2014; este estudo).

O aliñamento da matriz de ITS (ADN nuclear) resultou complexo pola súa alta variabilidade. Debido a isto, a matriz dividiuse en dúas submatrices antes da análise. Unha primeira submatriz inclúe as familias Araceae e Tofieldiaceae; namentres que a segunda inclúe ás restantes familias da orde. A división realizouse segundo os resultados de Les & Tippery (2013) e Couce (2014). Estas filoxenias amosan unha diferenciación clara entre as Araceae + Tofieldiaceae e os restantes grupos (Alismataceae + aliados). No caso das Alismataceae + aliados, a alta variabilidade observada supuxo que a filoxenia se baseara nas partes menos variables do aliñamento (rexión 5.8S).

As análises filoxenéticas iniciais fixéronse considerando e non considerando os *gaps* [os *gaps* foron introducidos nas análises filoxenéticas seguindo o procedemento (*simple coding*) descrito en Simmons & Ochoterena (2000)], sen que se observaran diferencias significativas na topoloxía ou no nivel de apoio das pólas da árbore. Polo tanto, non foron tidos en conta nas análises posteriores.

As análises de máxima parsimonia realizáronse empregando o software PAUP v.4 (Swofford, 2000). Este método realiza unha búsqueda da árbore filoxenética que requira do menor número de cambios evolutivos para explicar o aliñamento observado. Non precisa do establecemento de *priors* (asuncións *a priori* en relación ó modo de evolución da secuencia) e no noso traballo asumimos o mesmo peso para todos os caracteres do aliñamento.

A análise consistiu nunha busca heurística con 1.000 réplicas con orde de adición de secuencias aleatorio (*random addition sequence replicates*), utilizando a permutación de pólas de tipo TBR (*Tree bisection reconnection*). A fiabilidade dos nodos da topoloxía estableceuse mediante a técnica *bootstrap* con 1.000 réplicas. Finalmente obtívose a árbore consenso coa técnica do *majority rule*.

As filoxenias bayesianas non datadas leváronse a cabo co programa MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2005). Este test estima a probabilidade *a posteriori* das distintas topoloxías posibles mediante as cadeas de Markov e Montecarlo (MCMC). Para estas análises requírese o establecemento de *priors*, que sintetizan a información previa que se ten acerca das secuencias analizadas (Lemey *et al.*, 2009). O modelo de evolución estableceuse mediante o software MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). Esta análise concluiu que o modelo máis probable para todas as matrices cloroplásticas e para a matriz reducida de ITS (Alismataceae + aliados) é o GTR + I + G, namentres que o modelo máis axeitado no caso do grupo composto polas Araceae + Tofieldiaceae é o GTR + G.

Seguidamente realizouse a execución das análises, cada unha delas con 4 cadeas de Markov e 15.000.000 de xeracións e gardando unha topoloxía de cada 1.000. A converxencia das análises comprobouse mediante o software Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2014). Asimesmo, comprobouse mediante a medida *ad hoc* ofrecida polo propio programa e tamén empregando o servidor web AWTY (*Are we there yet?* Nylander *et al.*, 2004). Finalmente, construíronse as árbores consenso seguindo o procedemento do 50% *majority rule* implementado no propio software MrBayes. As análises Bayesianas foron realizadas no servidor gratuito *Cipres Science Gateway* da Universidade de San Diego (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>). As árbores resultantes foron editadas empregando o programa FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012).

Datación da filoxenia

A datación da filoxenia obtida realizouse co software BEAST v. 1.8.3 (Drummond *et al.*, 2012). Este paquete informático inclúe os programas BEAUTi, LogCombiner e TreeAnnotator. A análise realizada emprega métodos Bayesianos para, utilizando diversos parámetros como puntos (ou, máis

ben, funcións) de calibración, datar as filoxenias moleculares (Drummond *et al.*, 2012). Esta análise baséase na teoría do reloxo molecular, que permite datar a diverxencia entre dúas especies deducindo o tempo transcorrido a partir do número de diferencias entre dúas secuencias de ADN (Ho & Phillips, 2009). Ó tratarse dunha linaxe antiga, escolleremos o reloxo molecular relaxado en lugar do estricto (Brown & Yang, 2011). Este permite o cambio das taxas de mutación ó longo das pólas da topoloxía segundo unha función concreta. Nas análises de datación da diverxencia o reloxo molecular debe ser calibrado. Empregaremos dous puntos (ou funcións) de calibración:

- (i) as taxas de mutación para o cloroplasto estimadas por Wolfe *et al.*, (1987).
- (ii) fósiles pertencentes a distintos grupos da Orde Alismatales.

Nunha primeira revisión bibliográfica realizada por Couce (2014), seleccionáronse 24 fósiles en base a súa cobertura taxonómica e ecolóxica e segundo a claridade da súa atribución taxonómica. Finalmente, os fósiles empregados neste estudo (Táboa 2) foron escollidos pola súa distribución regular ó longo da filoxenia e pola non ambigüidade da súa datación (Ho & Phillips, 2009).

Especie	Fonte	Idade	Tipo de fósil	Grupo
<i>Pennistemon portugalicus</i> Fris, Pedersen & Crane.	1	Cretácico temperán (99,6 – 145,5 m.a)	Partes vexetativas	Araceae
<i>Cardstonia tolmanii</i> Riley & Stockey.	2	Campanian – Mastrichian (65,5 – 83,5 m.a)	Follas	Alismataceae
<i>Stratiotes</i>	3	Paleoceno tardío (55 – 65 m.a)	Flores modificadas	Hydrocharitaceae
<i>Thalassotaenia</i>	4	Cretácico tardío (65,5 – 99,6m.a)	Follas	Potamogetonoides

Táboa 2. Fósiles da Orde Alismatales utilizados como puntos de calibración. 1, Friis *et al.*, 2000; 2, Riley & Stockey, 2004; 3, Sille *et al.*, 2006; 4, Van der Ham, 2006.

De todas as posibles, a función para a calibración máis axeitada resultou a *log-normal* xa que asigna o punto de máxima probabilidade para a idade do nodo de maneira que sea lixeiramente anterior ó fósil máis antigo (Ho & Phillips, 2009). Á función engadiráselle tamén un límite inferior: a idade das monocotiledóneas segundo Magallón & Castillo (2009).

Como modelo de evolución empregouse o GTR + I + G, tal e como estableceu a análise levada a cabo co MrModelTest. Como *tree prior* empregouse o de Yule, que establece taxas de especiación descoñecidas nas pólas das árbores e non considera a taxa de extinción. Cada análise contaba con 100 millóns de xeracións (gardando un resultado de cada 10.000). A converxencia foi comprobada mediante o software Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2014).

RESULTADOS

Análises filoxenéticas

As topoloxías orixinadas polas rexións cloroplásticas *matK* e *rbcL* non mostraron incongruencias entre elas apoiadas estatisticamente. Desta forma, decidimos utilizar a matriz concatenada para presentar os nosos resultados, xa que con esta se obtivo unha mellor resolución dos nodos.

A matriz da rexión cloroplástica *matK* contaba con 1803 caracteres: 67 foron excluídos e 1156 (64,1%) resultaron parsimoniosamente informativos. A matriz da rexión *rbcL* estaba composta por 1504 caracteres, dos cales 922 foron excluídos e 585 (38,96%) resultaron parsimoniosamente informativos. Asimesmo, a matriz concatenada inclúe 3290 caracteres, dos cales 1678 foron excluídos e 1612 (48,9%) foron considerados parsimoniosamente informativos.

Ante a dificultade que presentaba o aliñamento das rexións do ITS nas Alismatales (especialmente as secuencias hipervariables do ITS1 e ITS2), a matriz de secuencias nucleotídicas dividiuse en dúas partes. Por unha banda, analizáronse as secuencias correspondentes ás familias Araceae e Tofieldiaceae. A continuación levouse a cabo a análise das restantes familias (Alismataceae + aliados). Esta división realizouse seguindo dous criterios: (i) os resultados das análises baseadas no cloroplasto e (ii) a similitude entre as secuencias. Ademais, no caso das Alismataceae + aliados a matriz empregada recortouse ata deixar unicamente a rexión 5.8S, a única da que se puido obter un aliñamento correcto. A matriz incluíndo as Araceae e as Tofieldiaceae constaba de 1111 caracteres, dos cales 244 foron excluídos e 873 (78,58%) resultaron parsimoniosamente informativos. Pola súa banda, a matriz composta polas Alismataceae + aliados constaba de 184 caracteres, dos cales 123 foron excluídos e 61 (33,15 %) manifestáronse parsimoniosamente informativos.

Posto que as topoloxías obtidas nas análises de parsimonia e Bayesianas non mostraron diferencias significativas, decidimos mostrar unicamente as baseadas nas análises Bayesianas, xa que o nivel de apoio estatístico é maior, en todos os casos, ca nas análises parsimoniosas.

Topoloxías obtidas

Os resultados da análise Bayesiana baseada nas rexións cloroplásticas *matK* e *rbcL* concatenadas (Fig. 4) amosan unha clara diferenciación entre os grupos externos (*outgroups*) e as Alismatales, que se amosan claramente monofiléticas. Dentro da orde obsérvanse dous grandes clados; un correspondente ás familias Araceae e Tofieldiaceae e o segundo agrupando ás restantes familias da orde:

- O primeiro gran clado divídese á súa vez en dous subclados irmáns, ambos monofiléticos: (i) a familia Araceae e (ii) a familia Tofieldiaceae, aínda que a relación entre ambas non conta cun bo

apoio estatístico (Fig. 4). A familia Araceae está composta por 9 subfamilias, todas monofiléticas a excepción de Aroideae e Philodendroideae. Gymnostachydoideae e Orontioideae aparecen como os grupos máis antigos.

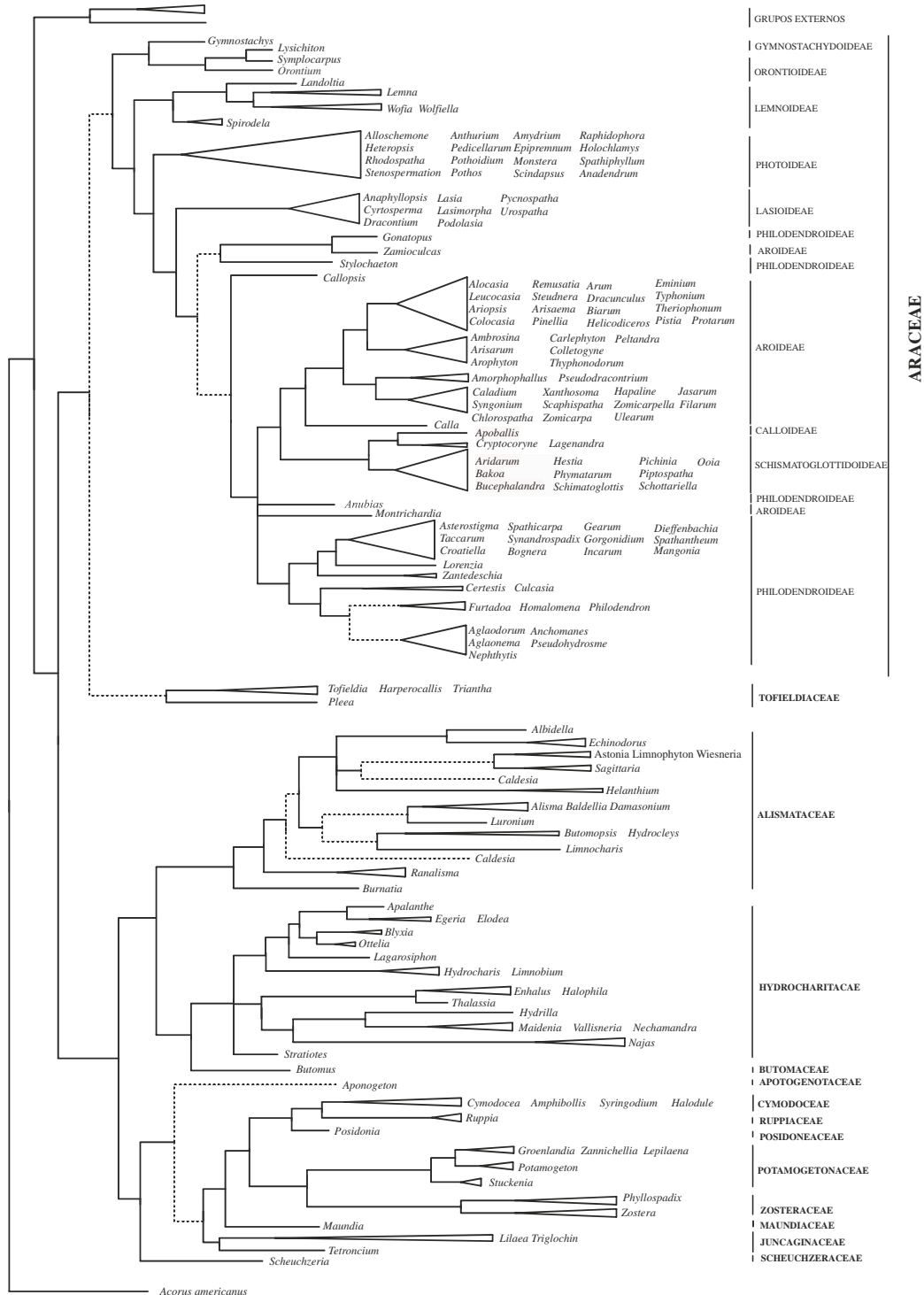


Figura 4. Topoloxía resultante da análise de 3290 caracteres das secuencias cloroplásticas (*matK* e *rbcL*) concatenadas. As pólas discontinuas representan nodos cun apoio estatístico (probabilidade posterior: PS) menor de 0,8.

- O segundo gran clado, divídese de igual modo en dous subclados: (i) o primeiro constituído polas familias monofiléticas Alismataceae, Hydrocharitaceae e Butomaceae, sendo esta última irmá das anteriores. (ii) O segundo subclado (tamén claramente monofilético) está composto polas familias Aponogetonaceae, Cymodoceaceae, Ruppiaceae, Posidoneaceae, Potamogetonaceae, Zosteraceae, Maundiaceae, Juncaginaceae e Scheuchzeraceae, sendo esta última irmá de todas as demais. A única familia deste segundo gran clado que non conta con un bo apoio estatístico é Aponogetonaceae (Fig.4).

A análise filoxenética baseada nas rexións nucleares ITS (ou, no caso das Alismatales + aliados, 5.8S) amosan unha moi baixa resolución (Fig. 5a e 5b).

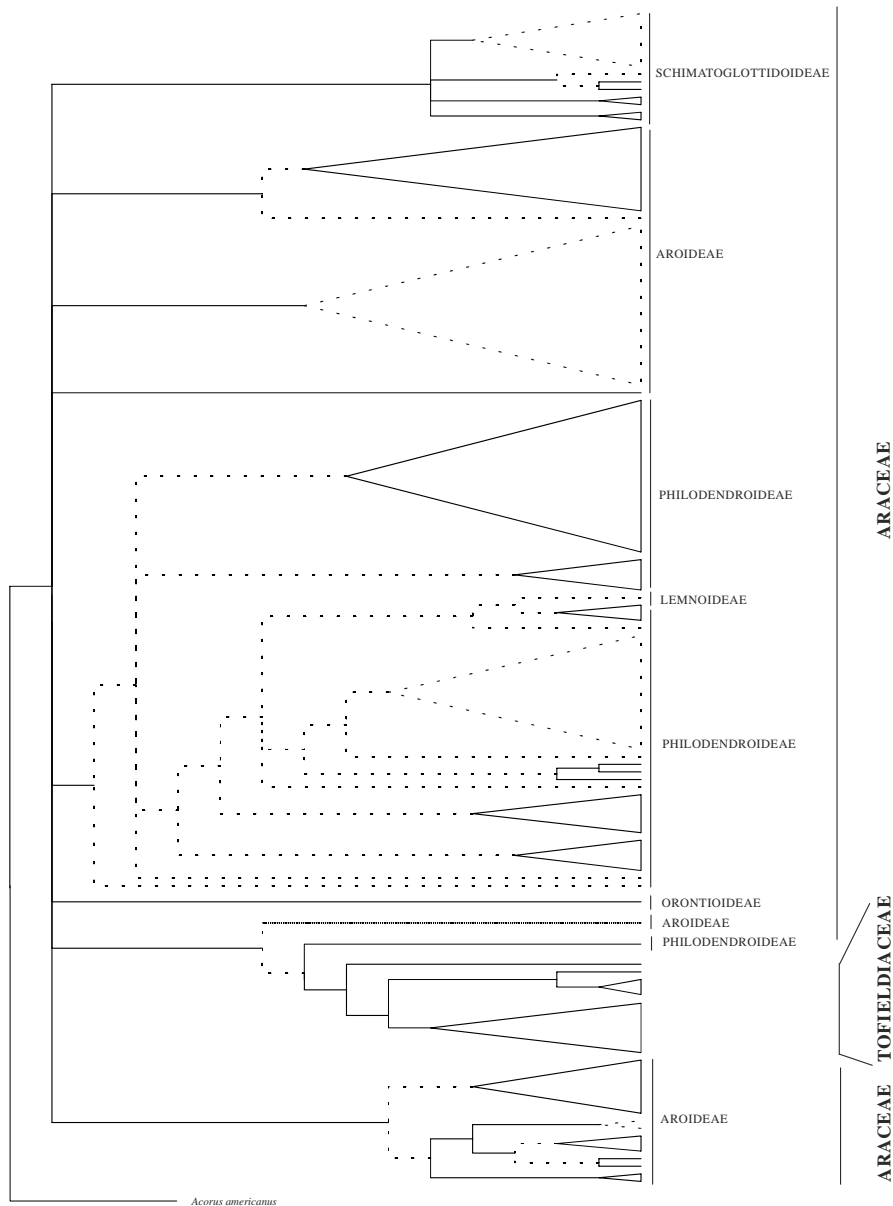


Figura 5a. Topoloxía resultante da análise de 1111 caracteres pertencenets ás familias Araceae e Tofieldiaceae das secuencias nucleares ITS. As pólas discontinuas representan nodos cun apoio estatístico (PS) menor de 0,8.

Así, obsérvase un nivel de apoio inferior en case todos os nodos a excepción de Aponogetonaceae, cuxa posición está ben apoiada (Fig. 5b). As familias son maioritariamente monofiléticas e coherentes co resto das topoloxías obtidas no presente traballo, se ben a posición filoxenética das mesmas non está resolta.

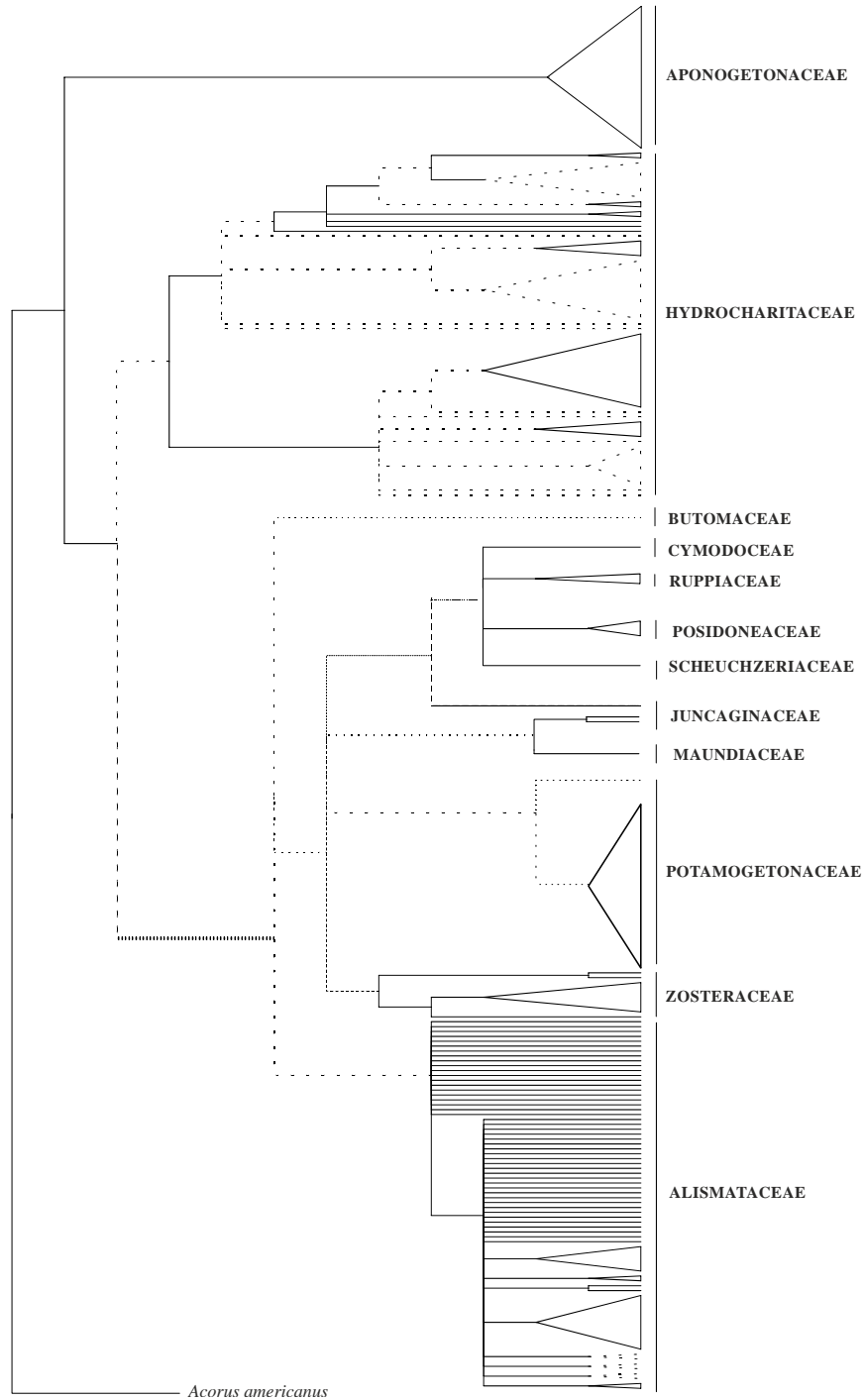


Figura 5b. Topoloxía resultante da análise de 184 caracteres pertencentes ás familias da Orde Alismatales (excepto Araceae e Tofieldiaceae) das rexión nuclear 5.8S. As pólas discontinuas representan nodos cun apoio estatístico (PS) menor de 0,8.

Filoxenias datadas

As Figuras 6a e 6b amosan unha filoxenia datada realizada co software BEAST (Drummond *et al.*, 2012). Con respecto á posición de clados e familias, a topoloxía coincide coa primeira amosada (Fig. 4). Ambas topoloxías están baseadas en análises Bayesianas asentadas nas rexións cloroplásticas *matK* e *rbcL* concatenadas.

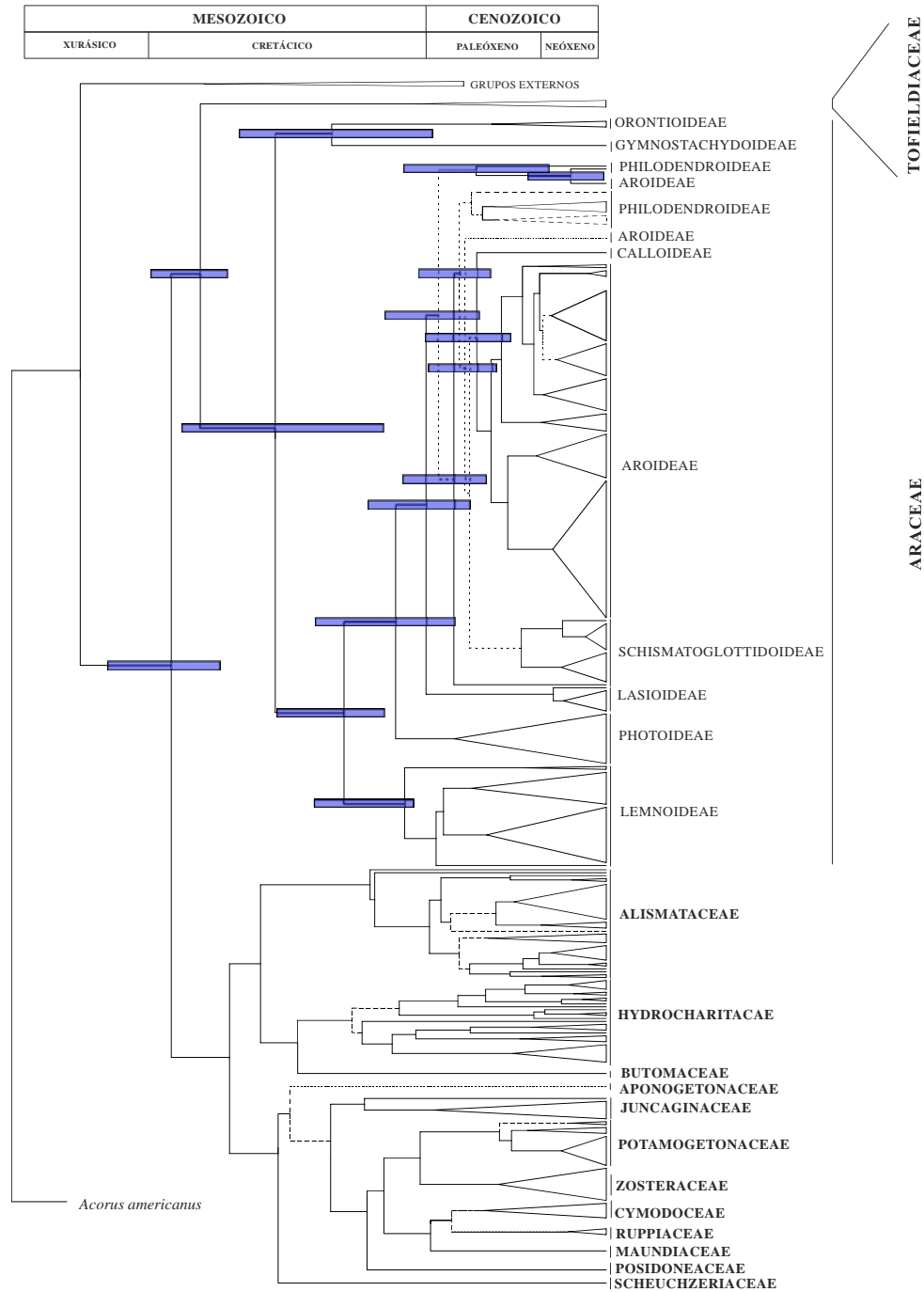


Figura 6a. Topoloxía datada resultante da análise de 3290 caracteres das secuencias cloroplásticas (*matK* e *rbcL*) concatenadas. As pólas discontinuas representan nodos cun apoio estatístico (PS) menor de 0,8.

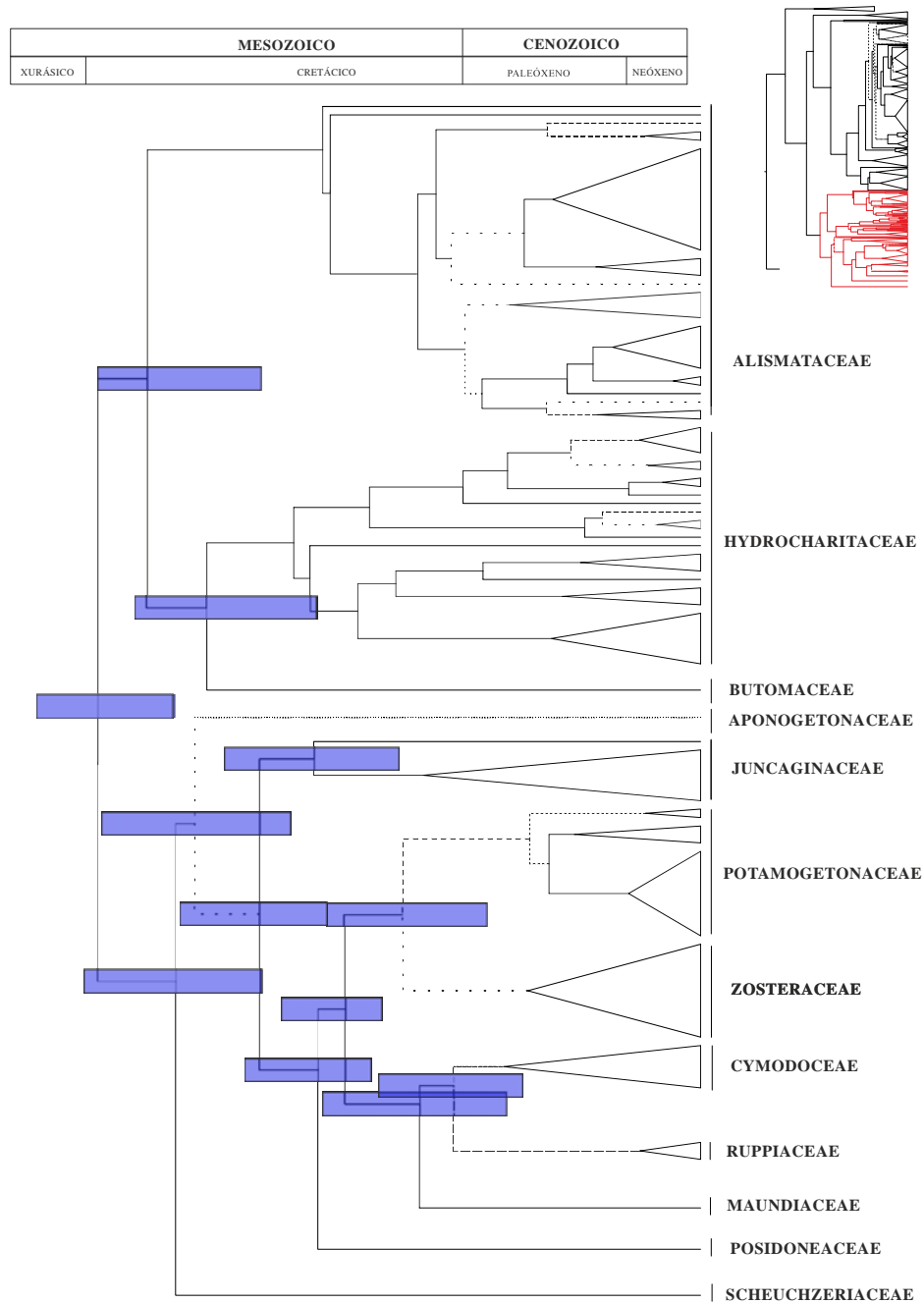


Figura 6b. Topoloxía datada resultante da análise de 3290 caracteres das secuencias cloroplásticas (*matK* e *rbcL*) concatenadas. Detalle do segundo clado. As pólas discontinuas representan nodos cun apoio estatístico (PS) menor de 0,8.

O resultado da nosa análise de datación sitúa a separación dos dous grandes clados (Araceae + Tofieldiaceae vs. Alismataceae + aliados) a finais do Xurásico – comezos do Cretácico (intervalo: 167 – 130 m.a). A diverxencia entre Araceae e Tofieldiaceae ocorreu nun intervalo similar ó anterior: 153 – 126 m.a, e a diversificación máis activa das Araceae (orixinando as subfamilias que existen na actualidade) tivo lugar entre finais do Cretácico e finais do Paleóxeno. Particularmente, a subfamilia Lemnoideae (na que todos os representantes son doceacuícolas) orixinouse a mediados -

finais do Cretácico (intervalo: 110 – 69 m.a) e a subfamilia Orontioideae (que tamén conta con representantes doceacuícolas) orixinouse a mediados/finais do Cretácico – inicios do Paleóxeno (intervalo: 123 – 59 m.a).

A división do segundo gran clado que se observa nas topoloxías (Fig. 6b): Alismataceae, Hydrocharitaceae e Butomaceae vs. Aponogetonaceae, Cymodoceaceae, Ruppiaceae, Posidoneaceae, Potamogetonaceae, Zosteraceae, Maundiaceae, Juncaginaceae e Scheuchzeraceae data de finais do Xurásico – comezos do Cretácico (intervalo: 167 – 130 m.a), e as orixes individuais de cada unha destas familias data de mediados - finais do Cretácico. Estas familias pódense considerar, polo tanto, contemporáneas. É de especial interese a data de orixe dos grupos integramente mariños. As familias Zosteraceae, Posidoneaceae, Cymodoceaceae e Ruppiaceae (que conta con representantes mariños, aínda que tamén doceacuícolas), datan de mediados do Cretácico. Desta mesma época datan tamén as especies mariñas pertencentes á familia Hydrocharitaceae. As diverxencias máis significativas detectadas no estudo resúmense na Táboa 3.

Diverxencias entre:	Intervalo (m.a)
Araceae + Tofieldiaceae vs. Alismataceae + Aliados	167 – 130
Araceae vs. Tofieldiaceae	153 – 126
Alismataceae + Hydrocharitaceae + Butomaceae vs. Aponogetonaceae + Cymodoceaceae + Ruppiaceae + Posidoneaceae + Potamogetonaceae + Zosteraceae + Maundiaceae + Juncaginaceae + Scheuchzeraceae	167 – 130
Alismataceae vs. Hydrocharitaceae + Butomaceae	145 – 110
Potamogetonaceae + Zosteraceae vs. Cymodoceaceae + Ruppiaceae + Maundiaceae	95 – 69

Táboa 3. Tempos de diverxencia entre os principais grupos e familias da Orde Alismatales.

DISCUSIÓN

Filoxenia das Alismatales

As filoxenias plásticas bayesianas obtidas (Figs. 4, 6a e 6b) contan cun apoio superior, na maioría dos nodos, que as resultantes das rexións nucleares multicopia ITS (Figs. 5a e 5b). Esta disparidade pode vencellarse: (i) ó número de caracteres empregados: 3290 no caso da matriz cloroplástica concatenada fronte a 1111 e 184 para cada unha das matrices de ITS; (ii) a que as rexións cloroplásticas seleccionadas resultan especialmente aptas para estes estudos pola súa alta variabilidade (e.g. Janssen & Bremer, 2004) ou (iii), a consecuencia de certas desvantaxes que presentan as rexións nucleares multicopia, como pode ser a existencia de secuencias diverxentes (Álvarez & Wendel, 2003). No noso caso, non temos observado a existencia de copias múltiples (non observamos diferencias apoiadas estatisticamente entre as dúas árbores).

As topoloxías obtidas neste estudo para as Alismatales non amosan grandes diferencias no referente á ordeación das familias (Figs. 4, 5a, 5b, 6a e 6b) con respecto ás filoxenias producidas nas derradeiras décadas (e.g. Les *et al.*, 1997; Les & Tippery, 2013; Couce, 2014). Porén, o nivel de apoio estatístico das filoxenias producidas neste traballo é notablemente superior (no caso das análises baseadas nas rexións cloroplásticas), o que probablemente se debe ó emprego dun maior número de variantes nucleotídicas. Isto deriva da concatenación de dúas rexións altamente variables (*matK* e *rbcL*).

Entre as relacións filoxenéticas non aclaradas por anteriores estudos cómpre salientar a posición da F. Tofieldiaceae. As nosas filoxenias plásticas e nucleares sitúan a este taxon como irmán da F. Araceae, amosándose cun bo apoio estatístico na filoxenia datada (Fig. 6a). A posición da familia Butomaceae, tampouco resolta por previos estudos, recóbrase neste caso como irmá da familia Hydrocharitaceae (Figs. 4 e 6b). De igual xeito, a familia Aponogetonaceae, tampouco resolta nos traballos publicados, móstrase como irmá de todas as demais no grupo Alismataceae + aliados (Fig. 5b). É interesante salientar que esta relación non recibe apoio estatístico na árbore baseada en DNA cloroplástico (Fig. 4), senón no nuclear, moito menos resolto para as restantes familias do grupo. Os resultados obtidos tamén permiten confirmar a posición de certos clados que, se ben cun baixo apoio estatístico, xa se observaba en anteriores estudos (Les & Tippery, 2013; Couce, 2014). Por exemplo, a familia Juncaginaceae recóbrase como irmá do clado que agrupa as familias Maundiaceae, Zosteraceae, Potamogetonaceae, Posidoneaceae, Ruppiaceae e Cymodoceaceae (1.0 PS). Asimesmo, as Ruppiaceae recóbranse como irmás das Cymodoceaceae (1.0 PS), e as subfamilias Gymnostachydoideae e Orointioideae (Araceae), aparecen tamén como grupos irmáns (Fig. 4).

Entre os grupos que a nosa filoxenia non foi quen de resolver cun bo apoio atópanse as subfamilias

Aroideae e Philodendroideae (Araceae). Será preciso realizar novos estudos empregando novas rexións nucleotídicas para resolver estes problemas.

A familia Araceae é claramente monofilética no noso estudo (Fig. 4). Esta monofilia está apoiada ademais polas numerosas sinapomorfías florais do grupo. As inflorescencias desta familia adoitan producir un forte olor e, nalgúns ocasións, calor; formando parte dunha estratexia para favorecer a polinización, que se leva a cabo por parte dunha gran variedade de insectos. Estes mecanismos xurdiron, probablemente, como adaptación a un medio tropical, hábitat onde as Araceae son máis diversas e onde a reprodución anemófila é complicada (Judd *et al.*, 2007). Se ben as Araceae son plantas principalmente terrestres, este patrón conta con excepcións moi salientables. Así, as subfamilias Lemnoideae e Orontioideae son completamente doceacuícolas e as subfamilias Aroideae, Philodendroideae e Schismatoglottidoideae contan tamén con algún representante de auga doce. As Lemnoideae son especialmente significativas xa que as súas diásporas se dispersan a través da auga (Judd *et al.*, 2007). O carácter “vida plenamente acuática” non é monofilético nas Araceae, tendo as Lemnoideae e as Orontioideae orixes diferentes. As Lemnoideae son ademais moi diverxentes morfoloxicamente (Judd *et al.*, 2007), o que probablemente se reflicte na súa posición filoxenética. Con respecto ás subfamilias parcialmente acuáticas, unha delas (Aroideae) aparece como non monofilética e a posición que ocupa na árbore non aparece ben apoiada estatisticamente (Figs. 5a e 6a). É interesante sinalar que as Araceae como familia, e tamén as subfamilias Lemnoideae e Orontioideae orixináronse, segundo os nosos resultados (Fig. 6a, ver tamén Magallón & Castillo, 2009), no Cretácico – comezos do Paleóxeno (Lemnoideae, 69 – 110 m.a.; Orontioideae, 59 – 123 m.a.). O clima no Cretácico, caracterizado polas altas temperaturas e alta humidade (Uriarte, 2003) probablemente facilitou este proceso de diversificación.

O gran clado que integra ás Alismataceae e aliadas (Figs. 4 e 5b), é tamén monofilético, e divídese da mesma forma en dous subgrupos estando o primeiro composto polas familias Alismataceae, Hydrocharitaceae e Butomaceae (a súa vez monofiléticas). Estas familias presentan grandes similitudes con respecto á ecoloxía, xa que todas dependen da auga para completar o seu ciclo de vida. Asimesmo, atopamos 3 xéneros dentro do clado (todos pertencentes á familia Hydrocharitaceae) completamente mariños. Isto supón un primeiro episodio de colonización deste medio na orde. Os restantes xéneros son doceacuícolas, cunha particularidade: a maioría dos pertencentes ás Alismataceae poden vivir tamén en medios terrestres húmidos (Li & Zhou, 2008). O segundo subgrupo (tamén claramente monofilético) está composto polas familias Aponogetonaceae, Cymodoceaceae, Ruppiaceae, Posidoneaceae, Potamogetonaceae, Zosteraceae, Maundiaceae, Juncaginaceae e Scheuchzeraceae, sendo esta última irmá de todas as demais. Todas as familias son monofiléticas e amosan unha gran diversidade ecolóxica malia sumar soamente 19 xéneros. Neste caso, a adaptación ó medio mariño prodúcese en 4 familias (Cymodoceaceae, Ruppiaceae,

Posidoneaceae e Zosteraceae), sendo os restantes representantes deste clado doceacuícolas e helofíticos, mais ningún integramente terrestre. As familias adaptadas ó medio mariño presentan claras adaptacións, tales como os caracteres ancilares (por exemplo pole filiforme adaptado á dispersión pola auga) ou a capacidade de vivir en medios de alta salinidade (Li & Zhou, 2008). Estas familias supoñen un segundo evento, dentro das Alismatales, de adaptación a un medio mariño. A nosa filoxenia indica que a evolución destes grupos tivo lugar a partir de familias anfíbias, tales como as Scheuchzeraceae ou Juncaginaceae, que actualmente acupan marismas e esteiros (Judd *et al.*, 2007). A análise de datación (Fig. 6b) sinala que a orixe das familias mariñas (e tamén doceacuícolas) deste clado tivo lugar no Cretácico, época de clima tropical e estable a nivel global e elevado nivel dos mares, na que probablemente unha ampla porcentaxe das costas estaba ocupada por humedais (Uriarte, 2003).

As filoxenias móstrannos ademais unha diversidade diferencial: as familias vinculadas ós medios acuáticos (Alismatales + aliados) son polo xeral menos diversas que incluso algunha das subfamilias pertencentes ás Araceae, isto podería explicarse por unha selección negativa en contra das plantas adaptadas a medios acuáticos probablemente debido ó custo que conleva a adaptación a estes medios. Moitos dos xéneros destas familias (e.g., *Zostera*, *Posidonia*, *Potamogeton*) presentan distribucións cosmopolitas ou case (Judd *et al.*, 2007), o que podería reflectir a posición dos continentes na época da súa orixe (Uriarte, 2003), que facilitaría a dispersión das plantas acuáticas, especialmente as mariñas.

As datas de orixe para cada unha das familias da Orde Alismatales publicadas ata o momento, atópanse dentro dos intervalos derivados das nosas filoxenias datadas; coa excepción de dúas. As familias Alismataceae e Hydrocharitaceae. Con respecto ás segundas, a data de orixe segundo Janssen & Bremer (2004) é de 75 m.a, namentres que os nosos resultados amosan unha data de diverxencia coas familias irmás no intervalo 110 – 145 m.a. Porén, a data da primeira diversificación que ocorre nesta familia (66 – 102 m.a; non amosado na nosa árbore), sí está próxima á publicada por Janssen & Bremer (2004). Aínda así, ningunha das idades inferidas a partir das filoxenias (Janssen & Bremer, 2004; este estudo) se inclúe no intervalo de datación do primeiro fósil de Hydrocharitaceae recoñecido con certeza (*Stratiotes*, Sille *et al.*, 2006), que data do Paleoceno tardío (61,7 – 65,5 m.a). Cómpre considerar que estes resultados proveñen de análises xerais, ben a nivel das monocotiledóneas (Janssen & Bremer, 2004), ou a nivel da Orde Alismatales (este estudo). As diferencias de datación poderían deberse ó método empregado, á necesidade de máis fósiles de referencia ou a unha baixa representación da familia, entre outras causas.

Con respecto ás Alismataceae, Chen *et al.*, (2012) datan a súa orixe en 79,4 m.a, namentres que os nosos resultados datan a diversificación no intervalo 110 – 145 m.a. De novo, esta data non reflecte exactamente a orixe das Alismataceae, senón o momento de diverxencia coas familias irmás. Os

nosos resultados indican que o intervalo para a primeira diverxencia dentro desta familia é 75 – 85 m.a, no que sí estaría incluída a data de Chen *et al.*, (2012). Neste caso, a data de orixe aportada por este autor sí é coherente co fósil máis antigo recoñecido (*Cardstonia tolmanii*; Riley & Stockey, 2004) que data do Campanian – Mastrichian (65,5 – 82,5 m.a). Ademais, o estudo de Chen *et al.*, (2012) é exclusivo das Alismataceae, polo que probablemente a nosa data sexa a que está sobreestimada.

En relación ó método de fixación de carbono, soamente dúas especies da familia Hydrocharitaceae (*Hydrilla verticillata* e *Egeria densa*) en toda a filoxenia das Alismatales presentan metabolismo C4. A diverxencia do xénero *Egeria* tivo lugar durante o Neóxeno (intervalo 1 – 15 m.a, non amosado na árbore) e a do xénero *Hydrilla* durante o Paleóxeno (intervalo 28 – 65 m.a, non amosado na árbore). Estas datas dispares, sumado a que os xéneros non están estreitamente relacionados na filoxenia, suxiren que a aparición deste carácter tivo dúas orixes independentes. A orixe do metabolismo C4 nas Alismatales é contemporáneo da súa aparición noutros grupos de monocotiledóneas, como as gramíneas (Bouchenak-Khelladi *et al.*, 2009). Estes eventos coinciden cunha época de baixada das temperaturas e da concentración de CO₂, patrón iniciado ó final do Paleóxeno (Uriarte, 2003). O metabolismo C4 ofrece vantaxes sobre o C3 en condicións de baixas concentracións de CO₂ e alta temperatura (Ehleringer *et al.*, 1997). A súa aparición nas datas sinaladas e no ambiente tropical no que habitan os xéneros *Egeria* e *Hydrilla* (Hydrocharitaceae) resulta moi coherente.

CONCLUSIÓNS

- Os resultados obtidos son coherentes coas filoxenias dos estudos previos, mais o apoio estatístico é notablemente superior.
- No presente traballo confirmamos a posición filoxenética dalgunhas familias [en todos os casos cunha probabilidade posterior (PS) > 0,8]. A familia Aponogetonaceae móstrase como irmá do grupo Alismataceae + aliados. A familia Butomaceae afianza a súa colocación como irmá da familia Hydrocharitaceae e a familia Juncaginaceae reforza a súa posición como irmá das familias íntegramente acuáticas Cymodoceaceae, Ruppiaceae, Posidoneaceae, Potamogetonaceae, Zosteraceae e Maundiaceae. Asimesmo, as Tofieldiaceae recóbranse como irmás das Araceae.
- A colonización do medio mariño por parte das Alismatales tivo lugar en distintos momentos da evolución, apreciándose converxencias adaptativas. Os taxa íntegramente mariños evolucionaron a partir de antergos anfibios.
- A orixe de cada unha das familias e subfamilias con representantes acuáticos data de finais do Cretácico – inicios do Paleóxeno, periodo no que dominou un clima tropical (temperatura e humidade elevada).
- O metabolismo C4 facultativo xurdiu dúas veces na Orde, dentro da familia Hydrocharitaceae. A orixe deste metabolismo nas Alismatales é contemporánea coa orixe noutros grupos como as gramíneas.

CONCLUSIONS

- The results are consistent with previous phylogenies; however we found higher statistical support for most diversification events.
- We have confirmed the phylogenetic position of some families of the Alismatales [in all cases with posterior probability (PS) > 0.8]. The F. Aponogetonaceae is shown as sister to the Alismataceae + allies group. Butomaceae strengthens its position as sister to the Hydrocharitaceae and finally, Juncaginaceae is reinforced as sister to the entirely aquatic families Cymodoceaceae, Ruppiaceae, Posidoneaceae, Potamogetonaceae, Zosteraceae and Maundiaceae. In addition to all this, the F. Tofieldiaceae is recovered as sister to the Araceae.
- The colonization of the marine habitat occurred at least twice in the evolution of the Alismatales. Several instances of convergent evolution can be found in this group. Entirely marine taxa evolved from amphibian ancestors.
- All families and subfamilies with aquatic members originated in the late Cretaceous – early Paleogene, under a tropical climate (high temperatures and humidity).
- C4 metabolism developed twice in this order, in the family Hydrocharitaceae. This metabolic transition is contemporary with others found in other monocot groups, such as the grasses.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez I., & Wendel JF.** 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29: 417-434.
- Bremer, K.** 2000. Early Cretaceous lineages of monocot flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 4707-4711.
- Bouchenak – Kelladi, Y., Verboom, G., Hodkinson, T., Salamin, N., Francois, O., Ní Chonghaile, G., & Savolainen, V.** 2009. The origins and diversification of C4 grasses and savanna - adapted ungulates. *Global Change Biology*. 15: 2397-2417.
- Brown, R. P., & Yang, Z.** 2011. Rate variation and estimation of divergences times using strict and relaxed clocks. *BMC Evolutionary Biology*. 11: 271.
- Chase, M., Fay, M., Devey, D., Maurin, O., Rønsted, N., Davies, T., & Rai, H. S.** 2006. Multigene analyses of monocot relationships: a summary. *Aliso*. 22: 63-75.
- Chen, J. M., Chen D., Gituru, R., & Wang, Q. F.** 2004. Evolution of apocarpy in Alismatidae using phylogenetic evidence from chloroplast *rbcL* gene sequence data. *Botanical Bulletin Academia Sinica Taipei*. 45: 33-40.
- Chen, L. Y., Chen, J. M., Gituru, R. W., & Wang, Q. F.** 2012. Generic phylogeny, historical biogeography and character evolution of the cosmopolitan aquatic plant family Hydrocharitaceae. *BMC Evolutionary Biology*. 12: 30.
- Couce, A.** 2014. Estudio evolutivo en el orden Alismatales. Universidade da Coruña. A Coruña.
- 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: 271-284.
- Crawford, R. M. M.** 2008. *Plants at the margin: Ecological Limits and Climate Change*. Cambridge University Press. Cambridge.
- 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: 1969-1973.
- Ehleringer, J., Cerling, T., & Helliker, B.** 1997. C4 photosynthesis, atmospheric CO₂, and climate. *Oecología*. 112: 285-299.
- Friis, E. M., Pedersen, K. R., & Crane, P.** 2000. Fossil floral structures of a basal angiosperm with monocolpate, reticulate-acolumellate pollen from the Early Cretaceous of Portugal. *Grana*. 39: 226-239.
- Friis, E. M., Crane, P., & Pedersen, K. R.** 2011. *Early Flowers and Angiosperm Evolution*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Givnish, T., Pires, J., Graham, S., McPherson, M., Prince, L., Patterson, T., & Sytsma, K.** 2006. Phylogenetic relationships of monocots based on the highly informative plastid gene *ndhF*: evidence for widespread concerted convergence. *Aliso*. 22: 28-51.
- Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O.** 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*. 27: 221-224.

- Haynes, R. R., & Holm-Nielsen, L. B.** 1994. The Alismataceae. *Flora Neotropica*. 1: 112.
- Ho, S., & Phillips, M.** 2009. Accounting for Calibration Uncertainty in Phylogenetic Estimation of Evolutionary Divergence Times. *Systematic Biology*. 58: 367–380.
- 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. J. (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: 385-398.
- Judd, S., Campbell, S., Kellogg, A., Stevens, F., & Donoghue, J.** 2007. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. Sinauer Associates. Sunderland.
- Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme A. M.** 2009. *The Phylogenetic Handbook*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Les, D. H., Cleland, M. A., & Waycott, M.** 1997. Phylogenetic studies in Alismatidae, II: evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. *Systematic Botany*. 22: 443-463.
- Les, D. H., & Tippery, N. P.** 2013. In time and with water... the systematics of alismatid monocotyledons. In: Wilkin, P. & Mayo, S. J. (eds.). *Early events in monocot evolution*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Li, X., & Zhou, Z.** 2008. Phylogenetic studies of the core Alismatales inferred from morphology and *rbcL* sequences. *Progress in Natural Science*. 19: 931- 945.
- Maddison, W., & Maddison, D. R.** 2009. *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 2.72. Disponible en: <http://mesquiteproject.org>
- Magallón, S., & Castillo, A.** 2009. Angiosperm diversification through time. *American Journal of Botany*. 96: 349-365.
- Nylander, J.** 2004. *MrModeltest v2*. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. Uppsala.
- Nylander, J., Wilgenbusch, J., Warren, D., & Swofford, D.** 2004. *AWTY: A system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetic inference*. Disponible en: <http://ceb.csit.fsu.edu/awty>.
- 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.
- Rambaut, A.** 2012. *FigTree v.1.4.0*. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D., & Drummond, A. J.** 2014. *Tracer v1.6*, Disponible en: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Riley, M. G., & Stockey, R. A.** 2004. *Cardstonia tolmanii* Gen. et sp. nov (Limnocharitaceae) from the upper Cretaceous of Alberta, Canada. *International Journal of Plant Sciences*. 165: 897-916.
- Roalson, E. H.** 2011. *C4 Photosynthesis Origins in the Monocots: A Review and Reanalysis*. School of

Biological Sciences and Center for Integrated Biotechnology, Washington State University. Washington.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., & van der Mark, P. 2005. *MrBayes 3.1 Manual*. Disponible en: mrbayes.sourceforge.net/manual.php

Sage, R., Christin, P. A., & Edwards, E. 2011. The C4 plant lineages of planet Earth. *Journal of Experimental Botany*. 1: 15

Sille, N., Collison, M., Kucera, M., & Hooker, J. 2006. Morphological Evolution of *Stratiotes* through the Paleogene in England: An Example of Microevolution in Flowering Plants. *Palaios*. 21: 272-288.

Simmons, M. P., & Ochoterena, H. 2000. Gaps and characters in sequence-based phylogenetic analysis. *Systematic Biology*. 49: 369-381.

Swofford, D. L. 2000. *PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony*, version 4.0. Smithsonian Institution. Washington DC.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. 2013. *MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0*. *Molecular biology and evolution*. 30: 2725-2729.

Uriarte, C. A. 2003. *Historia del Clima de la Tierra*. Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz.

Van der Ham, R. W. J., Cittert, J. H. A., & Indeharberge, L. 2006. Seagrass foliage from the Maastrichtian type area (Maastrichtian, Danian, NE Belgium, SE Netherlands). *Review of Paleobotany and Palynology*. 144: 201-321.

Wolfe, K. H., Li, W. H., & Sharp, P. M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 84: 9054-9058.