



Universitat de Girona

FILOGENIA Y GENÉTICA POBLACIONAL DEL GÉNERO ANDROCYMBIUM (COLCHICACEAE)

Alberto DEL HOYO LEAL

ISBN: 968-84-690-4262-5
Dipòsit legal: GI-I436-2006



FILOGENIA Y GENÉTICA POBLACIONAL
DEL GÉNERO *ANDROCYMBIUM*
(COLCHICACEAE)

ALBERTO DEL HOYO LEAL

Marzo 2006

JARDÍ BOTÀNIC MARIMURTRA

Y

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSITAT DE GIRONA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDIO AMBIENTE. BIENIO 2002 – 2004

**FILOGENIA Y GENÉTICA POBLACIONAL DEL GÉNERO *ANDROCYMBIUM*
(COLCHICACEAE)**

Memoria presentada para optar al título de Doctor en Biología por la Universitat de Girona por

ALBERTO DEL HOYO LEAL

DIRECTORES: DR. JOAN PEDROLA MONFORT Y DR. JOSÉ LUIS GARCÍA MARÍN

Dr. JOAN PEDROLA MONFORT

Lab. de Biologia Evolutiva de Plantes, Dept.
de Botànica, Facultat de Biològiques,
Universitat de València.

Dr. JOSÉ LUIS GARCÍA MARÍN

Lab. de Genètica, Dept. de Biologia,
Facultat de Ciències. Universitat de
Girona.

ALBERTO DEL HOYO LEAL

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Joan Pedrola-Monfort y al Dr. José Luis García-Marín, por dirigirme la tesis doctoral. Al área de genética de la Universitat de Girona por haberme ayudado a secuenciar todas las muestras. A Laura Piferrer y Montse Samper, antiguas becarias del Jardí Botànic Marimurtra, por su inestimable ayuda en el análisis y la interpretación de los marcadores RAPD. Al Dr. Martí Cortey y a Manel Vera, por enseñarme toda las técnicas relacionadas con la secuenciación del DNA. Al Dr. Juli Caujapé-Castells y a la Dra. Nuria Membrives, por su interés y colaboración a la hora de discutir diferentes aspectos relacionados con el género *Androcymbium*. A la Dra. Karin Persson, por su inestimable ayuda en la discusión de diversos aspectos relacionados con el género *Colchicum*. A Laia Pedrola, por haberme ayudado en la clonación del DNA. A Dolors Isern, por su ayuda en la extracción de DNA. A la Fundació Karl Faust, por la ayuda económica concedida para la realización de esta tesis y a su director, Jordi Masbernat, por haber confiado en mi.

Va por ti Camborio!

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado el género *Androcymbium* (Colchicaceae) a dos niveles: macro- y micro- evolutivo. A nivel microevolutivo se ha obtenido que para las especies de Sudáfrica oriental la componente interpoblacional es muy importante para explicar la distribución de la variabilidad genética, igual que en Sudáfrica occidental. Para las especies de Namibia, la componente mas importante es la intrapoblacional, igual que en el norte de África. A nivel macroevolutivo se ha obtenido que el origen del género se sitúa en Sudáfrica occidental, datándose en $11,2\pm 2$ ma. Este género ha resultado ser parafilético, dada la aparición conjunta en un mismo clado de especies de *Androcymbium* y *Colchicum*, y las especies del norte de África derivan de un taxa de Namibia que llegó a la cuenca Mediterránea a principios del Plioceno gracias a la formación de un corredor árido entre las zonas áridas del suroeste y este de África.

RESUM

En aquest treball s'ha estudiat el gènere *Androcymbium* (Colchicaceae) a dos nivells: macro- i micro- evolutiu. A nivell microevolutiu s'ha obtingut que per les espècies de Sudàfrica oriental, la component interpoblacional es molt important per explicar la distribució de la variabilitat genètica, igual que a Sudàfrica occidental. Per les espècies de Namibia, la component mes important es la intrapoblacional, igual que al nord d'Àfrica. A nivell macroevolutiu s'ha obtingut que l'origen del gènere es situa a Sudàfrica occidental, datant-se en $11,2\pm 2$ ma. Aquest gènere ha resultat ser parafilètic, donat l'aparició conjunta en un mateix clade d'espècies d'*Androcymbium* i *Colchicum*, i les espècies del nord d'Àfrica deriven d'un taxa originari de Namíbia que va arribar a la conca Mediterrània a principis de Pliocè gràcies a la formació d'un corredor àrid entre les zones àrides del sud-oest i est d'Àfrica.

ABSTRACT

In this study the genus *Androcymbium* (Colchicaceae) has been studied at two levels: macro- and micro- evolutive. At the microevolutive level it has been obtained that in the western south African species, the inter-populational component is very important to explain the distribution of the genetic variability, the same case like in western South Africa. In the Namibian species, the main component in the intra-populational, the same case as in north Africa. At the macroevolutive level it has obtained that the origin of the genus is located in western South Africa and it has been dated in 12.2 ± 2 mya. This genus is paraphyletic because of the inclusion of some species of *Colchicum* within *Androcymbium*, and the origin of the northern Africa taxa are related with a Namibian taxa that colonized the Mediterranean basin at the beginning of Pliocene thanks to the formation of an arid corridor between the arid areas of south-western and eastern Africa.

SUMARIO

Introducción	1
Familia Colchicaceae y género <i>Androcymbium</i>	6
Capítulo 1: Características biológicas de las especies de Namibia y Sudáfrica oriental	31
Capítulo 2: Genética poblacional de las especies de Namibia y Sudáfrica oriental	
Introducción	61
Material y métodos.....	64
Resultados.....	76
Discusión.....	86
Conclusiones	96
Capítulo 3: Filogenia del género <i>Androcymbium</i>	
Introducción	99
Material y métodos.....	101
Resultados.....	133
Discusión.....	173
Conclusiones	202
Discusión general	205
Bibliografía	209
Anexos.....	233

Introducción

INTRODUCCIÓN

Desde que Charles Darwin publicó el mecanismo de la selección natural que explicaba el origen de la biodiversidad biológica y establecía así las bases de la Teoría Evolutiva, se han producido cambios esenciales en todo el cuerpo teórico de esta Teoría. Relacionado con estos cambios, resaltaremos tres fenómenos clave que han ocurrido en estos últimos años en las diversas disciplinas que la componen: (i) los métodos cladistas basados en la teoría de Hennig (1966) acordes con los postulados epistemológicos de Karl Popper y por tanto generadores de hipótesis falsables, (ii) los descubrimientos de la bioquímica del DNA y sus mecanismos de replicación así como el nacimiento de las técnicas de análisis molecular, basadas en la enzima termoestable de *Thermus aquaticus* Taq polimerasa, que ha permitido la amplificación automatizada de cualquier fragmento de DNA (reacción llamada PCR) y (iii) la informática aplicada al cálculo computacional y sus consecuencias en la automatización y el tratamiento de una inmensidad de datos. Se han abierto así, muy recientemente, unas inmensas posibilidades en los estudios de la biología evolutiva de los organismos, en base al estudio multigénico con diversos marcadores moleculares. Con estas nuevas metodologías, podemos penetrar en los cambios moleculares de los organismos, plantear hipótesis históricas sobre su evolución y tratar de relacionar esta evolución molecular con la morfológica. También se abre la posibilidad de analizar la evolución organísmica y relacionarla con los cambios históricos, tanto con sus correspondientes áreas biogeográficas, ambientales o geológicos, que sin duda han sido muy influyentes y decisivas en su dinámica evolutiva. Se abre así una nueva posibilidad de penetrar en la otra esfera del famoso “misterio de los misterios”, en este caso la evolución de las angiospermas a partir de sus historias ambientales relacionadas con su filogenia. La posibilidad de obtener actualmente hipótesis evolutivas basadas en datos moleculares y relacionarlas con el tiempo geológico de formación de sus áreas bióticas y con sus historias ambientales, está permitiendo entender las bases moleculares de los cambios morfológicos en la evolución de los taxa, las expansiones y contracciones filogeográficas de sus poblaciones, sus direcciones colonizadoras, sus zonas refugio y los tiempos y modos de especiación de las especies.

En estos momentos y dadas estas premisas, el objetivo base de esta tesis es estudiar la filogenia y la genética poblacional del género *Androcymbium* y discutir, en base a los conocimientos actuales, la fiabilidad, consistencia y robustez de los resultados y sus implicaciones sobre determinadas hipótesis de la historia evolutiva de este género.

¿Por qué el género *Androcymbium* como objeto de estudio de la genética de poblaciones y de su filogenia?

Muchos trabajos sobre biogeografía africana han resaltado que uno de los fenómenos más fascinantes en la actualidad y en la botánica son las relaciones florísticas entre las zonas áridas del norte y el sur de África (De Winter 1971; Jürgens 1997). El 63% de los géneros de la flora xerofítica del norte de África cuentan con especies representadas en su zona simétrica austral, es decir la región sudafricana (Monod 1971). El género *Androcymbium* forma parte de este 63%. Este género consta de 56 especies. El 11% se encuentran en el Norte de África – Islas Canarias, el 16% en Sudáfrica Oriental, el 9% en el Sur y el Este de África central y el 64% restantes en Sudáfrica Occidental.

Este género pertenece a la familia Colchicaceae, dentro del orden de las Liliales. Las especies de esta familia son generalmente geófitos que emergen con las lluvias de finales de otoño y entran en senescencia en primavera. En verano están en fase de reposo y lo pasan en forma de cormo enterrado para protegerse de la aridez. El estudio pues, de este género, tiene diferentes niveles de interés:

Nivel Taxonómico: su sistemática desde Linneo hasta la actualidad ha sido y esta siendo objeto de constantes revisiones. En los últimos años se han modificado los niveles de clasificación infragenéricos en base a aspectos morfológicos (sobre todo, florales) y se han descrito más de 16 nuevas especies (Müller-Doblies & Müller-Doblies 1984, 1990, 1998, 2002; Pedrola-Monfort et al, 1999a, 1999b, 2003). Es por ello que, y de acuerdo con las últimas aportaciones en los estudios taxonómicos, sería necesario realizar una nueva revisión utilizando las más recientes técnicas moleculares para ayudar a clarificar las controversias existentes con respecto a su taxonomía.

Nivel Biogeográfico: su distribución geográfica es bastante peculiar, ya que su rango geográfico ocupa áreas disjuntas; Norte y Sur de África. Esta distribución, que no solo es exclusiva de este género, resulta interesante de estudiar con el objeto de obtener un patrón biogeográfico que pudiera servir como modelo para explicar estas habituales disjunciones geográficas norte – sur de la flora xerofítica sudafricana .

Nivel de Especiación: conocer los diferentes tipos de especiación, así como las causas que las han promovido en las diferentes áreas disjuntas de su distribución, puede servir como modelo para los otros géneros de la flora xerofítica.

Nivel Filogenético: sus hipótesis filogenéticas, así como la datación de su especiación y consecuentemente de sus diversos procesos evolutivos que han producido cambios morfológicos (tiempo de separaciones basados en el reloj molecular), pueden servir para conocer las causas y los procesos que han generado esta evolución. De esta manera, también se puede comparar con la evolución de otros géneros de la flora xerofítica africana y establecer así modelos evolutivos para estas floras en el continente africano.

Los estudios poblacionales y evolutivos previos sobre *Androcymbium*.

A lo largo de estas últimas décadas (1989 – 2004) se han realizado 15 expediciones de recogida de material de estudio *in situ* en las diferentes áreas disjuntas del género *Androcymbium*. Primero por diferentes regiones de la zona norte; España (Almería e Islas Canarias), Grecia (Creta), Israel, norte de África (Marruecos, Argelia y Túnez), y segundo, por la zona sudafricana; Namibia y Sudáfrica (regiones occidentales y orientales). Dentro de esta área sudafricana nos encontramos también con una interesante distribución geográfica disjunta, donde la mayor diversidad específica observada se encuentra en Sudáfrica occidental. Aquí es pues donde más atención y más trabajo de recolección se ha requerido durante estos últimos años en las expediciones mencionadas. Como consecuencia de ello, se ha dispuesto de una importante colección del género *Androcymbium* con más de 2000 individuos repartidos entre 75 poblaciones de 29 especies de todo el continente africano, sur del mediterráneo y Oriente Medio, siendo todas ellas endémicas o de ámbito geográfico muy reducido. Todos los individuos fueron recogidos mediante un cuidadoso muestreo basado en

transectos con el fin de obtener de cada taxa una muestra estadísticamente representativa de la variabilidad poblacional, tanto molecular como morfológica, en la colección. Las características biológicas de estas especies han facilitado su recolección y su mantenimiento en el invernadero del Jardí Botànic Marimurtra (a partir de ahora J.B.M.), dado que son plantas bulbosas de un tamaño relativamente pequeño, permitiendo así disponer de una gran colección de planta viva *ex situ*. Con todo este material, se han realizado diversos trabajos de investigación, entre ellos tres tesis doctorales (Pedrola-Monfort 1993, Caujapé-Castells 1995, Membrives 2000), una tesina (Margelí 1995) y mas de 20 publicaciones en diferentes revistas científicas. Los primeros estudios realizados durante la década de los 90', se centraron en las especies del norte de África, estudiando su morfología, sus características vitales y analizando la cantidad y el comportamiento de la variabilidad genética con la técnica del análisis aloenzimático. Posteriormente se realizaron los mismos estudios con las especies de Sudáfrica occidental. El objetivo de estos primeros trabajos era describir morfológicamente estas especies, analizar sus características vitales y estudiar la cantidad y la distribución de la variabilidad genética. En 1999 se realizó la primera filogenia del género con cpDNA – RFLP's contando solamente con las poblaciones del norte de África y algunas de Sudáfrica occidental (Caujapé-Castells et al. 1999).

Disponer de una colección como esta implica la posibilidad de monografiar, a diversos y amplios niveles de profundidad, un grupo taxonómico. Ello es, sin duda, uno de los objetivos esenciales y paradigmáticos de cualquier científico naturalista, y de cualquier equipo o de cualquier línea de investigación en Historia Natural y ha sido la guía del amplio proyecto de investigación realizado durante los últimos años con este género.

Objetivos Generales planteados en este trabajo.

Los principales objetivos de esta tesis fueron dos:

El primero fue analizar la variabilidad genética y estudiar las características vitales y la biología reproductiva de cuatro especies de Sudáfrica oriental y tres especies del centro de Namibia, nunca antes estudiadas a este nivel. De esta manera se cubrían las dos áreas de distribución de este género que aun no se habían analizado. Se

consideró esencial estudiar las especies de estas áreas, ya que prometían ser muy interesantes a la vista de los resultados obtenidos en trabajos previos (Pedrola-Monfort & Caujapé-Castells 1996; Caujapé-Castells et al. 1999, 2001; Membrives et al. 2001), y sobretodo para testar las hipótesis sugeridas a lo largo de las investigaciones anteriormente efectuadas. Aprovechando pues el estudio de la variabilidad genética de estos siete taxa, también se ha realizado un estudio completo, a modo de síntesis, de la estructura genética de las poblaciones y especies de todo este género en todas las áreas de su distribución en el continente africano. Ello nos permite comparar los datos de variabilidad genética de estos siete taxa con los obtenidos previamente en las especies del norte de África y Sudáfrica oriental, con el objetivo de analizar como se comporta la variabilidad genética en todas las áreas de distribución del género.

El segundo objetivo planteado era realizar una más completa filogenia del género, ya que se contaba con especies de todas sus áreas de distribución, y comprobar así la posición filogenética de las especies de Sudáfrica oriental y Namibia dentro de la evolución de *Androcymbium*. También se planteó establecer si la actual distribución del género se debe a procesos de dispersión o vicarianza, y datar los procesos evolutivos utilizando diversas metodologías para la obtención y calibración del reloj molecular para así conocer los tiempos de evolución de los taxa y del género.

Introducción a la familia Colchicaceae

La familia Colchicaceae pertenece al orden de las Liliales y comprende aproximadamente 225 especies distribuidas en áreas templadas y tropicales de África, Europa, Asia, Australia y Norte América. La familia fue establecida en 1805 por De Candolle, quién incorporó seis géneros: *Bulbocodium*, *Colchicum*, *Merendera*, *Erythronium*, *Tofieldia* y *Veratrum*. Los primeros tres géneros son todavía miembros de esta familia (habitualmente se encuentran incluidos dentro del género *Colchicum*), mientras que los tres últimos se consideran en la actualidad miembros de las familias *Liliaceae*, *Tofieldiaceae* y *Melanthiaceae* respectivamente (APG 1998, 2003; Kubitzki 1998). Autores posteriores no siguieron la proposición taxonómica de De Candolle y trataron aquellos taxa como parte de *Liliaceae* sensu lato. Por ejemplo Baker (1879) incluye estas seis especies en el suborden Colchicaceae dentro del orden Liliales. Posteriormente Krause (in Engler 1930) reordena la familia Liliaceae en varias subfamilias, entre ellas *Melanthioideae*, donde crea la tribu *Melanthioidea – Anguillariae* y la tribu *Melanthioidea – Colchicaceae*. En 1936 Buxbaum creó una nueva subfamilia dentro de *Liliaceae*, la *Wurmbeoideae*, donde incluyó 13 géneros: *Androcymbium*, *Anguillaria*, *Baeometra*, *Colchicum* (incluyendo *Bulbocodium*, *Merendera* y *Synsiphon*), *Dipidax* (= *Onixotis*), *Gloriosa*, *Iphigenia*, *Iphigeniopsis* (= *Camptorrhiza*), *Littonia*, *Neodregea*, *Ornithoglossum*, *Sandersonia* y *Wurmbea*. Esta agrupación de géneros propuesta por Buxbaum (1936) creó un grupo homogéneo inicialmente diferenciado por la presencia de un “rizoma cormoso”. La posterior detección del alcaloide colchicina proporcionó un carácter químico que daba sentido a esta subfamilia *Wurmbeoideae*. Las clasificaciones mas modernas reconocen a este grupo de géneros de esta subfamilia como los formadores de la familia *Colchicaceae* (Dahlgren 1985; Nordenstam 1986; APG 1998, 2003). En la década de los 90', los resultados de diversos estudios moleculares indicaron que algunos otros géneros deberían asignarse también a la familia *Colchicaceae*. Estos géneros eran *Burchardia*, *Disporum*, *Tripladenia* y *Uvularia* (Chase et al. 1993, 1995; Rudall et al. 1997), incrementándose así el número hasta 17. Nordenstam (1998) incluyó a los géneros *Hexacyrtis* y *Schelhammera*, por lo que la familia se expandió a 19 géneros y aproximadamente 225 especies.

En la actualidad, la familia *Colchicaceae* se subdivide de manera informal en dos subfamilias que incluyen respectivamente a los llamados géneros wurmbeoideos y géneros uvularioideos (Nordenstam 1998; Thorne 2000). Según Nordenstam (1982, 1998), al primer grupo (wurmbeoideos) se asignan cuatro tribus: (i) *Anguillarieae*, que comprende tres géneros distribuidos por África y Australia (*Neodregea* C. H. Wright, *Onixotis* Raf. y *Wurmbea* Thunb. – incluyendo este a *Anguillaria* R.Br.) y se caracteriza por tener flores sésiles, sin brácteas y con inflorescencia en espiga, el polen es monosulcado y número cromosómico $x = 10, 11$; (ii) *Baeometreae*, que comprende un único género distribuido por Sudáfrica (*Baeometra* Salisb. Ex Endl) y se caracteriza por tener inflorescencias bracteadas en forma de racimo (en algunos casos reducido a espiga), polen monosulcado y número cromosómico $x = 11$; (iii) *Colchiceae*, que comprende dos géneros distribuidos por África, Europa y Asia central (*Androcymbium* Willd. y *Colchicum* L. [incl. *Bulbocodium* L., *Merendera* Ram. y *Synsiphon* Regel]) y se caracteriza por presentar flores axilares, habitualmente en racimos muy densos, o terminales y solitarias, el polen presenta un número variable de poros (entre 2 y 4) y el número cromosómico es muy variable en función de la especie ($x = 7, 8, 9, 10, 11, 12, 19$); (iv) *Iphigenieae* que comprende siete géneros distribuidos en África, Asia tropical, Australia y Nueva Zelanda (*Camptorrhiza* Phill. [syn. *Iphigeniopsis* Buxb.], *Hexacyrtis* Dtr., *Iphigenia* Kunth, *Littonia* Hook., *Sandersonia* Hook. y *Ornithoglossum* Salisb) y se caracteriza por presentar flores axilares, dispuestas en racimo, el polen es monosulcado y número cromosómico $x = 11, 12$. Además, basándose en las evidencias moleculares de Chase et al. (1993, 1995), Nordenstam (1998) incluyó en este grupo de las wurmbaeoideas al género *Burchardia*, aunque no lo asignó a ninguna tribu. Los géneros uvularioideos (*Disporum*, *Kuntheria*, *Schelhammera*, *Tripladenia* y *Uvularia*) se considera que forman una sola tribu, *Uvulariaceae*. La inclusión de esta tribu en la familia *Colchicaceae* ha sido motivo de discusión. Dahlgren (1985) la consideró como perteneciente a la familia *Uvulariaceae*, mientras que estudios mas recientes (Nordenstam 1998; Vinnerstern & Reeves 2003) la incluyen dentro de la familia *Colchicaceae*.

Revisión histórica de la clasificación del género *Androcymbium*

Inicialmente, las especies que hoy conocemos como género *Androcymbium* Willd. habían estado descritas por Linné dentro del género *Melanthium* L., en la clase *Hexandra Triginia*. El género *Melanthium* contaba en el siglo XVIII con una amplia representación de especies distribuidas por los continentes Africano y Americano (Linné 1764; Palau i Verdera 1785a, 1785b; Schrebero 1787, 1789; Willdenow 1799). La primera mención escrita de una especie del actual género *Androcymbium* fue *Melanthium capense* en la obra de Linné *Species Plantarum*, traducida por primera vez al castellano por Palau i Verdera (1785a, b): “el *Melanthium capense*, Melanthio del Cabo de Buena Esperanza (Sudáfrica) de pétalos con puntitos y hojas a la manera de cogollo”. En la cuarta edición de *Species Plantarum* de Linné realizada por Willdenow (1799), se amplía el número de especies del género *Melanthium* y se reconocen algunas nuevas especies que corresponden al actual *Androcymbium* (*M. ciliatum* Willd., *M. eucomoides* Willd., *M. fecundum* Willd., *M. junceum* Willd., *M. uniflorum* Willd., *M. viride* Willd.), todas ellas de Sudáfrica. Cavanilles (1801a), describió dos nuevas especies de *Melanthium* sobre materiales recolectados por Brousonet en la costa atlántica de Marruecos (*M. gramineum* Cav. y *M. punctatum* Cav.). En las ilustraciones de Cavanilles (1801b) es fácil reconocer al actual *Androcymbium gramineum* (Cav.) Mc Bride.

Este aumento en el conocimiento del género tuvo como consecuencia la segregación del primitivo *Melanthium* en dos géneros. Las especies americanas (se diferencian del resto por presentar los tépalos sin uña) se incluyeron en el género que conserva el nombre original de Linné, *Melanthium*, y las especies africanas (que se caracterizan por presentar el tépalo diferenciado en lámina y uña) se incluyeron en un nuevo género llamado *Androcymbium* (Willdenow 1808). Este nombre se traduce del griego como “cazuela masculina”, y hace referencia a la forma cóncava del conjunto de la flor, donde el pistilo queda escondido y sobresalen los estambres. En aquel momento, *Androcymbium* solo reconocía a tres especies: *A. eucomoides* Willd., *A. leucanthum* Willd. y *A. melanthioides* Willd.

Como resultado de la descripción de nuevas especies dentro de *Androcymbium*, Schlechtendal (1826) segregó el género en dos a partir de las diferencias que observa en la morfología del tépalo: género *Androcymbium* Willd. y género *Erythrostickus*

Schlechtld. El género *Androcymbium* incluye los taxones que presentan “*phylla unguiculata supra ungem convoluto-cucullata, cucullo intus staminifero et nectarifero*” (corresponde a la actual sección *Androcymbium*). Este género *Androcymbium* incluye las tres especies descritas por Willdenow (1808). El género *Erythrostictus*, presenta taxones que se caracterizan por “*phylla plana subunguiculata, supra ungem punctis dubus nectariferis instructa*” (corresponde a la actual sección *Erythrostictus*). En este género se incluyeron las dos especies descritas por Cavanilles, llamandose *Erythrostictus gramineae* (um) y *E. punctata* (us).

Aunque en los siguientes años se amplia el estudio de ambos géneros (Roemer & Schultze 1830; Kunth 1843) y se describen nuevas especies en Sudáfrica (*A. dregei*, Presl 1844; *A. striatum*, Hochstetter 1851) y en la Península Ibérica (*E. europaeum*, Lange; en Willkomm & Lange 1870), no es hasta los trabajos de Baker (1874, 1879) que se vuelve a realizar una profunda revisión. En su trabajo publicado en 1874, este autor describe siete nuevas especies de *Androcymbium* en Sudáfrica (*A. burkei* Baker, *A. burchellii* Baker, *A. cuspidatum* Baker, *A. longipes* Baker, *A. punctatum* Baker, *A. subulatum* Baker y *A. volutum* Baker) y organiza el género en tres grupos en función de la similitud de los hipsófilos (brácteas) respecto a los nomófilos (hojas). El primer grupo presenta los hipsófilos diferentes en forma y textura a los nomófilos, y habitualmente presentan estriaciones verticales y horizontales verdes. Este grupo lo forman *A. melanthioides*, *A. striatum* y *A. subulatum*. El segundo grupo se caracteriza por tener los hipsófilos más cortos y redondeados que los nomófilos, nunca estriados, y lo forman *A. burchellii*, *A. cuspidatum*, *A. eucomoides*, *A. leucanthum* y *A. volutum*. El último grupo se caracteriza por poseer los hipsófilos con tamaño, color y textura similar a los nomófilos, y lo forman las especies *A. burkei*, *A. longipes* y *A. punctatum*. El propio Baker, en 1879, reagrupa nuevamente a los géneros *Androcymbium* y *Erythrostictus* en un solo género *Androcymbium*. Incluye dentro de *A. punctatum* (Cav.) Baker las siguientes especies: *Melanthium punctatum* Cav., *M. gramineum* Cav., *Erythrostictus punctata* Schltr., *E. gramineae* Schltr. y *E. europaeum* Lange. También modifica la posición taxonómica de *A. striatum* como una variedad de *A. melanthioides*, y describe una nueva especie encontrada en Palestina como *A. palaestinum*. Poco después, Bentham & Hooker (1883) reestructuran la taxonomía del género en dos secciones, *Cymbanthes* (que

mas adelante se llamará sección *Androcymbium*) y *Erythrostictus*, siguiendo las mismas características que había utilizado Schlechtendal (1826) para diferenciar los géneros *Androcymbium* y *Erythrostictus*. En la sección *Cymbanthes* se incluyen las especies con la lámina cóncava y aurículas en la base, en su mayoría de origen sudafricano. En la sección *Erythrostictus* se incluyen a las especies con la lámina plana y sin aurículas en la base. Las especies de esta última sección tienen una distribución norteafricana, a excepción de *A. dregei* que se encuentra en Sudáfrica occidental. Engler (1889) incorpora una nueva especie sudafricana a esta sección, *A. roseum* Engl., muy similar al *A. punctatus* de Cavanilles.

En los años siguientes se van describiendo nuevas especies en Sudáfrica que aumentan el tamaño de la sección *Cymbanthes*. Así, Schinz (1896) describe *A. albomarginatum* Schinz, *A. crispum* Schinz y *A. latifolium* Schinz; Baker (1897) describe *A. natalense* Baker; Engler (1902) describe *A. hantamense* Engl.; Schönland (1904) describe *A. albanense* Schönland; Brown (1906) describe *A. decipiens* N. E. Br. y Engler (1910) propone una nueva especie, *A. pritzelianum* Engl., similar a *A. crispum*, y que mas tarde serán consideradas sinónimas. Dentro de la sección *Erythrostictus*, Mc Bride (1918) crea un nuevo taxa, *Androcymbium gramineum* (Cav.) Mc Bride, donde incluye los taxones que pertenecían a *A. punctatum* Baker.

En 1921, Krause publica una revisión completa del género donde incluye a las nuevas especies descritas hasta la fecha y aporta ocho nuevas especies de distribución sudafricana (*A. ciliolatum* Schltr. & K. Krause, *A. fenestratum* Schltr. & K. Krause, *A. guttatum* Schltr. & K. Krause, *A. irroratum* Schltr. & K. Krause, *A. pulchrum* Schltr. & K. Krause, *A. scabromarginatum* Schltr. & K. Krause y *A. schlechteri* K. Krause, dentro de la sección *Cymbanthes*, y *A. bellum* Schltr. & Krause dentro de la sección *Erythrostictus*). En este trabajo, el autor diferencia una nueva sección monotípica, sect. *Degreocymbium*, donde solo se incluye a *A. dregei*. Las características que definen esta nueva sección son el tallo epigeo, la lámina del tépalo plana, estambres mucho mas cortos que el tépalo y estilos minúsculos. La validez de esta sección es cuestionada a partir del trabajo de Roessler (1974). Este autor describió la especie *A. exiguum* Roessler en Namibia y, aunque muy similar morfológicamente a *A. dregei*, la asignó a la sección *Erythrostictus* y no a la *Degreocymbium* como le correspondería dadas las características morfológicas de

esta. Posteriormente, Müller-Doblies & Müller-Doblies (1984) dudan de la validez de la sección *Dregeocymbium* e incluyen la única especie de esta sección, *A. dregei*, dentro de la sección *Erythrostictus*. Estos autores, incorporan cuatro nuevas especies a la sección *Cymbanthes* (*A. henssenianum* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, *A. poeltianum* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, *A. villosum* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies y *A. vogelii* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies) y una a la sección *Erythrostictus* (*A. cruciatum* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies). Además fusionan la especie *A. fenestratum* como sinónimo de *A. ciliolatum* y establecen dos complejos de especies de indefinida posición: el complejo *A. capense* (compuesto por *A. austrocapense*, *A. capense*, *A. eucomoides* y *A. hantamense*) y el complejo *A. gramineum* (compuesto por todas las especies del norte de África y por *A. roseum*).

En el norte de África, Beauverd (1938) describe una nueva especie encontrada en El Golea y Gardaia (Algeria) como *A. wyssianum* Beauverd & Turrerini; Sventenius (1960) describe una nueva especie de las islas de Lanzarote y Fuerteventura que llama *A. psammophilum* Svent.; Greuter (1967) descubre una nueva especie en la isla de Creta (Grecia) que llama *A. rechingeri* Greuter. Esta nueva especie descrita por Greuter parece ser la misma que la descrita como *A. punctatus* Cav. por Duran & Barrete (1910) en Tripolitania (Libia) y posteriormente combinada por Maire (1934) como *A. gramineum* var. *punicum*. Es por ello que Greuter aprovecha para realizar una revisión del complejo *A. gramineum* (Cav.) Mc Bride, dada la dificultad en distinguir el valor taxonómico de las diferencias morfológicas observadas entre los ejemplares asignados a la especie. Esta complejidad es heredada de los diversos taxones que desde los trabajos iniciales de Cavanilles con *Melanthium gramineum* y *M. punctatum* se asignaron posteriormente a la especie *A. punctatum*, y que Mc Bride consideró como *A. gramineum*. Greuter establece como “buenas” las siguientes especies: *A. gramineum* (Cav.) Mc Bride (que afirma diferenciarse mucho de *A. europaeum* (Lange) Ritcher. porque tiene las cápsulas mas grandes que esta última especie), *A. europaeum* (Lange) Ritcher., *A. palaestinum* Baker, *A. psammophilum* Svent., *A. rechingeri* Greuter y *A. wyssianum* Beauver & Turrett. También en la región del norte de África, Santos-Guerra (1977, 1980) describe una nueva especie de las islas de El Hierro y La Palma llamada *Androcymbium hierrensis* Santos. En la isla de La Gomera, Reifenberger (1990) descubre

una población emparentada con *A. hierrensis* y la establece como subespecie de esta. Propone el cambio del nombre incorrecto *A. hierrensis* por *A. hierrense*, y basándose en diferencias inconspicuas crea dos subespecies: *A. hierrense* subsp. *hierrense* (Santos) Reifenger (poblaciones de El Hierro y La Palma), *A. hierrense* subsp. *macrospermum* (Santos) Reifenger. Actualmente se considera *A. hierrense* a las poblaciones de estas tres islas.

Müller-Doblies & Müller-Doblies (1998) proponen una compleja reorganización de la sección *Androcymbium* (sinónimo de *Cymbanthes*) del género *Androcymbium* en dos subsecciones, *Androcymbium* y *Gradatocymbium*, basándose en la secuencia de hojas y en la ecología floral. La subsección *Androcymbium* se divide en seis series: la serie *Androcymbium* (donde se describe *A. orienticapense* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies), la serie *Eghimocymbia* (donde se describen tres nuevas especies: *A. eghimocymbion* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, *A. undulatum* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies y *A. vanjaarsveldii* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, en Sudáfrica occidental), la serie *Melittocymbia* (donde se describe *A. austrocapense* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies), la serie *Myiocymbia*, la serie *Schlechterocymbia* y la serie *Therocymbia*. La serie *Schlechterocymbia* incluye la especie *A. bellum*, que hasta la fecha estaba incluida en la sección *Erythrosticktus*. La subsección *Gradatocymbium* se divide en la serie *Gradatocymbia* (donde se describen dos nuevas especies: *A. leistneri* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies y *A. swazicum* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, ambas en Sudáfrica oriental), y en la serie *Trifoliata* (donde se describen tres nuevas especies: *A. hughocymbion* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, *A. kunkelianum* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies y *A. worsonense* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, en Sudáfrica occidental). Aparte de la descripción de estas diez nuevas especies, invalidan la sinonimia propuesta por Reid (1993) que consideraba *A. decipies* y *A. natalense* sinónimos de *A. longipes*, validando así la asignación de especie a los tres taxa según criterios morfológicos, de distribución altitudinal y diferencias fenológicas. Además, observan que las especies *A. pulchrum* y *A. schlechteri* descritas por Krause (1921), corresponden a *A. latifolium* y *A. albomarginatum* respectivamente, descritas anteriormente por Schinz (1896).

Pedrola-Monfort et al. (1999a) describen una nueva especie de Sudáfrica occidental dentro de la sección *Androcymbium*, *A. huntleyi* Pedrola, Membrives, J. M. Monts. y Caujapé. Poco después también describen dos nuevos taxones de Sudáfrica occidental y dentro de la misma sección: *A. walteri* Pedrola, Membrives y J. M. Monts., y *A. albanense* Schönland subsp. *clanwilliamense* Pedrola, Membrives y J. M. Monts. (Pedrola-Monfort et al. 1999b). Goldblatt & Manning (2000) proponen incluir dentro de *A. eucomoides* a los taxa descritos en Müller-Doblies & Müller-Doblies (1998) *A. austrocapense*, *A. eghimocymbion* y *A. undulatum*, y dentro de *A. capense* a los taxa *A. ciliolatum*, *A. hantamense* y *A. irroratum*. Manning & Goldblatt (2001) describen una nueva especie, *A. asteroides* J. C. Manning & Goldblatt distribuida por el centro de Sudáfrica y asociada siempre a cursos fluviales. Posteriormente esta especie también fue encontrada en el sureste de Namibia.

Müller-Doblies & Müller-Doblies (2002) proponen otra nueva reorganización del género dividiéndolo en cinco secciones: *Erythrostictus*, *Dregeocymbium*, *Marlothiocymbium*, *Kunkeliocymbium* y *Androcymbium*. En la sección *Erythrostictus* incluyen a las especies del norte de África y *A. roseum*. Esta última especie deciden dividirla en dos subespecies en función del color, la longitud del tépalo y su distribución geográfica: *A. roseum* subsp. *roseum* Engl. y *A. roseum* Engl. subsp. *albiflorum* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, este último como sinónimo del *A. asteroides* descrito por Manning & Goldblatt (2001). Deciden recuperar la sección *Dregeocymbium* que habían eliminado en Müller-Doblies & Müller-Doblies (1984) e incluir las especies *A. dregei* y *A. exiguum*. Crean una nueva sección monotípica, *Marlothiocymbium* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, donde incluyen a *A. cruciatum*. Proponen cambiar la categoría taxonómica de la subsección *Gradatocymbium* de la sección *Androcymbium*, descrita en Müller-Doblies & Müller-Doblies (1998), y crean la sección *Kunkeliocymbium* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies. Describen la nueva especie *A. stirtonii* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies dentro de la serie *Gradatocymbia* de esta nueva sección. Dentro de la sección *Androcymbium* describen nueve nuevas especies, seis dentro de la serie *Eghimocymbia* (*A. amphigaripense* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, *A. buchubergense* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, *A. etesionamibiense* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, *A. greuterocymbium* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-

Doblies, *A. knervlaktense* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies y *A. preairroratum* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies), dos dentro de la serie *Melittiocymbia* (*A. cedarbergense* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies y *A. karooparkense* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies) y una dentro de la serie *Therocymbia* (*A. crenulatum* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies).

Pedrola-Monfort et al. (2003) proponen reestructurar la categoría taxonómica de *A. latifolium* incluyendola como subespecie de *A. burchellii* (*A. burchellii* subsp. *burchellii* Baker y *A. burchellii* subsp. *pulchrum* (Schltr. & K. Krause) Pedrola, Membrives, J. M. Monts., Caujapé).

Distribución y descripción morfológica del género *Androcymbium*.

El género *Androcymbium* Willd. está formado por 56 especies que se distribuyen por regiones áridas del continente africano y en una pequeña zona del sur de Europa, encontrando el 89% de las especies en el sur de África (Fig. A; Tabla A). La gran mayoría (el 64%) se encuentran en la zona occidental de Sudáfrica (norte y oeste de la Provincia del Cabo) y el sur de Namibia, mientras que el resto de especies del sur del continente africano se encuentran en la región oriental de Sudáfrica (este de la Provincia del Cabo, Kwazulu-Natal, Mpumalanga, Free State) Lesotho, Swaziland, Zimbabwe, Botswana, centro y norte de Namibia y Angola. En el norte del continente se encuentran seis especies, dos de ellas distribuidas en las Isla Canarias y las cuatro restantes en el sur de la Península Ibérica (provincia de Almería), Marruecos, Mauritania, Argelia, Túnez, Libia, Egipto, Israel, Palestina y Grecia (Isla de Creta). La especie que presenta una distribución mas amplia es *A. melanthioides*, ya que se han localizado poblaciones el centro y norte de Namibia, norte y este de Sudáfrica y Swaziland. *Androcymbium striatum*, especie muy similar a *A. melanthioides*, habita por el noroeste y noreste de la provincia del Cabo, Lesotho y Swaziland, distribuyéndose ampliamente por las montañas orientales de África hasta Tanzania, Kenia y Etiopia. La especie *A. roseum* también presenta una amplia distribución geográfica por estepas tropicales, con poblaciones en Namibia y Angola, y radiando hacia el este por Botswana, Zimbabwe y Zambia. Todas las especies del género, a excepción de estas tres con amplia distribución geográfica, son endémicas o de distribución muy

reducida, y muchas de ellas, sobretodo las de Sudáfrica, están únicamente representadas por una población.

Las especies del género *Androcymbium* son geófitos (Raunkiaer 1934) con un ciclo vegetativo anual. Son plantas adaptadas a vivir en zonas áridas con un periodo desfavorable de sequía estival que pasan enterradas en forma de cormo tunicado. El cormo actúa como órgano de reserva y contiene principalmente almidón. El catafilo es una hoja basal que envuelve el cormo, se endurece durante el periodo de reposo y aparece al año siguiente como una túnica coriacea. En algunas especies las túnicas desaparecen debido a su consistencia membranosa. Los nomófilos (u hojas), emergen a través del catafilo y se disponen generalmente formando una roseta basal. En muchos casos, los hipsófilos (o bracteas) presentan una textura, morfología y coloración diferente a los nomófilos (hojas). Las inflorescencias son terminales y las flores son trímeras, actinomorfas, hipogineas y hermafroditas. Las flores son sésiles o subsésiles, y presentan seis tépalos diferenciados en lámina y uña. Cada tépalo presenta un estambre inserto en la base de la lámina. Los nectarios se encuentran en la base del filamento (en la parte anterior, posterior o formando un anillo), y el néctar se acumula entre la base del estambre y la lámina. La lámina del tépalo de muchas especies, presenta unas prolongaciones en la base en forma de aurículas. Las anteras son dorsifixas o subbasifixas, con dehiscencia longitudinal y pueden ser introsas o extrosas. El pistilo es tricarpelar y trilocular, con tres estiloides libres desde la base. Cada lóculo contiene óvulos anátropos. Los estigmas son generalmente puntiformes, pero en algunas especies forman un estigma lineal donde las papilas estigmáticas descienden por la parte interior del estilo unos pocos milímetros. El fruto es una cápsula indehiscente o dehiscente con obertura septicida. Las semillas son globosas y pueden presentar el rafe desarrollado formando una carúncula. La testa de la semilla esta formada por diferentes capas de células. El endospermo de la semilla contiene almidón. En cada ciclo vegetativo se generan hojas y flores al mismo tiempo, hecho que se conoce como sinantia. Como todos los miembros de la familia Colchicaceae, *Androcymbium* presenta ácido quelidónico y alcaloides, principalmente colchicina, y en su caso concretamente androcymbina (Wildman & Purse 1968). Estos componentes son

extremadamente tóxicos y se utilizan en medicina, citología y genética, y en estudios de reproducción vegetal para inducir la formación de poliploides.

Androcymbium se divide actualmente en cinco secciones (Tabla A) (Müller-Doblies & Müller-Doblies 2002) en base a varios caracteres morfológicos diferenciadores: *Erythrostickus* (Schlecht.) Benth., caracterizada por presentar la lámina plana sin aurículas en la base (Bentham & Hooker 1883); *Dregeocymbium* K. Krause, caracterizada por presentar los filamentos mas pequeños de 2 mm. (Krause 1921); *Marlothiocymbium* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, caracterizada por tener los cuatro nomófilos iguales dispuestos en forma de cruz, estos miden aprox. 20 mm., los filamentos carecen de glándulas basales y los estilos son 2,5 – 3 veces las largos que el ovario (Müller-Doblies & Müller-Doblies 2002); *Kunkeliocymbium* U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, caracterizada por presentar hipsófilos verdes, aunque pueden ser un poco coloreados en la base, estilos decurrentes y estigma con papilas a lo largo de una sutura longitudinal o puntiformes. (Müller-Doblies & Müller-Doblies 2002); *Androcymbium* (Willd.) U. Müll.-Doblies & D. Müll.-Doblies, características morfológicas distintivas de las sección no descritas (Müller-Doblies & Müller-Doblies 1998, 2002).



Fig. A: distribución geográfica del género *Androcymbium*. Zona donde se encuentran el 64% de las especies.

Tabla A: Especies del género *Androcymbium* (en negrita especies analizadas en este estudio)

Género *Androcymbium* Willd., Ges. Naturf. Freunde Berlin Mag. Neuesten Entdeck. gesammten Naturk. 2: 21 (1808)

Sección *Erythrostickus* (Schltdl.) Benth. in Bentham & Hooker, Gen. pl. 3 (2): 828 (1883)

- A. asteroides* J.C.Manning & Goldblatt, Bothalia 31 (2): 203 (2001)
- A. gramineum* (Cav.) McBride, Contr. Gray Herb. 53: 5 (1918)
- A. hierrense* Santos, Fund. Juan March, Ser. Univ., Cienc. Agrar. 114: 44 (1980)
- A. palaestinum* Baker, J. Linn. soc., Bot. 17: 445 (1879)
- A. psammophilum* Svent., Addit. fl. Canar. 1: 1 (1960)
- A. rechingeri* Greuter, Candollea 22: 248 (1967)
- A. roseum* Engl., Bot. Jahrb. Syst. 10: 282 (1889)
- A. wyssianum* Beauverd & Turrett., Candollea 7: 371 (1938)

Sección *Dregeocymbium* K.Krause in Krause, Notizbl. Bot. Gart. Berlin 7: 512 (1921)

- A. dregei* C.Presl, Abh. Königl. Böhm. Ges. Wiss., ser. 5, 3: 546 (1845)
- A. exiguum* Roessler subsp. *exiguum*, Mitt. Bot. Staatssamml. München 11: 553 (1974)
- A. exiguum* Roessler subsp. *vogelii* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Willdenowia 19: 453-470 (1990)

Sección *Marlothiocymbium* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies in Müller-Doblies & Müller-Doblies, Feddes Repert. 113: 558 (2002)

- A. cruciatum* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Willdenowia 14: 179-197 (1984)

Sección *Kunkeliocymbium* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies in Müller-Doblies & Müller-Doblies, Feddes Repert. 113: 558-564 (2002)

- Serie *Gradatocymbia* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 553 (1998)
 - Subserie *Gradatocymbia* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 554 (1998)
 - A. decipiens* N.E.Br., Kew Bull. 29 (1906)
 - A. longipes* Baker, J. Bot. 12: 246 (1894)
 - A. natalense* Baker in Th. Dyer, Fl. capens. 6: 519 (1897)
 - Subserie *Swazicymbia* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 556 (1998)
 - A. burkei* Baker, J. Bot., 12: 246 (1874)
 - A. stirtonii* U.Müll.-Doblies, Raus, Weiglin & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 561 (2002)
 - A. swazicum* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies in Müller-Doblies & Müller-Doblies, Feddes Repert. 109: 556-557 (1998)
 - Subserie *Leistnerocymbia* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 557 (1998)
 - A. albanense* Schönland **subsp. albanense**, Re. Albany Mus. 1: 123 (1904)

- A. albanense* Schönland **subsp. *clanwilliamense*** Pedrola, Membrives & J.M.Monts.,
Fontqueria 54 (2): 7-9 (1999)
- A. leistneri* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies in Müller-Doblies & Müller-Doblies, Feddes
Repert. 109: 557-559 (1998)
- A. poeltianum* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Willdenowia 14: 188 (1984)
- A. walteri* Pedrola, Membrives & J.M.Monts., Fontqueria 54 (2) : 7-9 (1999)
- Subserie *Pachystyla* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 559-560 (1998)
- A. henssenianum* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Willdenowia 14: 190 (1984)
- A. huntleyi* Pedrola, Membrives, J.M.Monts. & Caujapé, Fontqueria 53: 1 (1999)
- Serie *Trifoliata* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 559 (1998)
- A. cuspidatum* Baker, J. Bot. 12: 245 (1874)
- A. kunkelianum* U.Müll.-Doblies, P.Hirsch, Stearn & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 559
(1998)
- A. hughocymbion* U.Müll.-Doblies, P.Hirsch, Stearn & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 560
(1998)
- A. worsonense* U.Müll.-Doblies, P.Hirsch, Stearn & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 559-560
(1998)

Sección *Androcymbium* Benth. in Bentham & Hooker, Gen. pl. 3 (2): 882 (1883)

- Serie *Eghimocymbia* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 560 (1998)
- Subserie *Albomarginata* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 564-569 (2002)
- A. albomarginatum* Schinz, Bull. Herb. Boiss. 4: 415 (1894)
- A. eucomoides* (Jacq.) Willd., Ges. Naturf. Freunde Berlin Mag. Neuesten Entdeck. Gesamnten
Naturk. 2: 21 (1808)
- A. greuterocymbium* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 568 (2002)
- A. knersolaktense* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 569-570 (2002)
- A. scabromarginatum* Schltr. & K. Krause, Notizbl. Bot. Gart. Berlin-Dahlem 7: 518 (1921)
- A. undulatum* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 562 (1998)
- A. vanjaarsveldii* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 563 (1998)
- Subserie *Namibiocymbia* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 569-571 (2002)
- A. amphigaripense* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 569-570 (2002)
- A. buchubergense* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 570 (2002)
- A. etesionamibense* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 570-571 (2002)
- Subserie *Irrorata* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 571-573 (2002)
- A. irroratum* Schltr. & K.Krause, Notizbl. Bot. Gart. Berlin-Dahlem 7: 520 (1921)
- A. praeirroratum* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 572-573 (2002)
- Subserie *Eghimocymbia* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 573 (2002)
- A. eghimocymbion* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 563-564 (1998)

- Serie *Myiocymbia* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 564 (1998)
- A. circinatum* Baker, J. Linn. Soc., Bot. 17: 443 (1879)
 - A. villosum* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Willdenowia 14: 187 (1984)
 - A. volutare* Burch., Trav. S. Africa 1: 213 (1822)
- Serie *Therocymbia* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 5652 (1998)
- A. burchellii* Baker **subsp. burchellii**, J. Bot., 12: 246 (1874)
 - A. burchellii* Baker **subsp. pulchrum** (Schltr. & K.Krause) Pedrola, Membrives, J.M.Monts. & Caujapé, Bot. Macaron., IV Ci. 24: 113 (2003).
 - A. crenulatum* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 574 (2002)
- Serie *Melittocymbia* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 567 (1998)
- A. austrocapense* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 568 (1998)
 - A. capense* (L.) K.Krause, Notizbl. Bot. Gart. Berlin-Dahlem 7: 515 (1921)
 - A. cedarbergense* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 578-579 (2002)
 - A. ciliolatum* Schltr. & K.Krause, Notizbl. Bot. Gart. Berlin-Dahlem 7:515(1920)
 - A. crispum* Schinz, Bull. Herb. Boissier 4: 415 (1894)
 - A. hantamense* Engl., Bot. Jahrb Syst. 32: 89 (1902)
 - A. karooparkense* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 113: 578 (2002)
- Serie *Androcymbium* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 569-571 (1998)
- A. melanthioides* Willd. subsp. *australe* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 570 (1998)
 - A. melanthioides* Willd. subsp. *melanthioides* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 569 (1998)
 - A. melanthioides* Willd. subsp. *transvaalense* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 570 (1998)
 - A. orienticapense* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 571 (1998)
 - A. striatum* Hochst. ex A.Rich., Tent. fl. Abyss. 2: 336 (1848) in G. W. Schimp., Pl. Abyss. n. 1338 (1842) [in sched.] nom. nud.
-
- Serie *Schlechterocymbia* U.Müll.-Doblies & D.Müll.-Doblies, Feddes Repert. 109: 571 (1998)
- A. bellum* Schltr. & K. Krause, Notizbl. Bot. Gart. Berlin-Dahlem 7: 515 (1921)

Tabla B: Especies utilizadas como grupos externos (outgroups) para la filogenia.

Familia Colchicaceae DC., Essai Propr. Méd. Pl.: 56. (1804)

Baeometra uniflora (Jacq.) G.J.Lewis, Journ S. Afr. Bot. vii. 59 (1941)

Bulbocodium vernum L., Sp. Pl. 294 (1753)

Colchicum lusitanum Brot., Phyt. Lusit. ii. 211. t. 173, 174. (1827)

Gloriosa superba L., Sp. Pl. 305 (1753)

Merendera androcymbioides B.Valdes, Lagasalia, 7(2): 161 (1977 publ.1978)

Merendera filifolia Cambess., Mem. Mus. Par. xiv. 319 (1827)

Merendera montana Lange, Willk. & Lange, Prod. Fl. Hisp. i. 193. (1861)

Onixotis stricta (Burm f.) D.O.Wijnands, Bothalia 21 (2): 157 (1991)

Familia Alstroemeriaceae Dumort., Anal. Fam. Pl.: 57, 58. (1829)

Alstroemeria aurantiaca D.Don, The British Flower Garden 6 (1833)

Las abreviaciones de los autores se expresan según Brummit & Powell (1992), los trabajos autónomos según Stafleu & Cowan (1976-1988), Stafleu & Mennega (1992-1993) y las publicaciones según Lawrence et. al (1968) y Bridson & Smith (1991).

Tabla C: Poblaciones muestreadas de *Androcymbium* y especies outgroup para este estudio. Todas las recolecciones se realizaron durante el periodo 1989 - 2003 por el Dr. Joan Pedrola-Monfort y su equipo. Localización de las especies de Sudáfrica y Namibia realizada utilizando el *Degree Reference System* (Leistner & Morris 1976), sistema ampliamente utilizado por los biólogos Sudafricanos.

Especie	Localidad	Código	Recolección
Norte de Africa			
<i>A. gramineum</i>	Barranco de Curriá, Almería. ESPAÑA	JBM GR-BC	12/89
<i>A. gramineum</i>	Cerro de los Peligros, Almería. ESPAÑA	JBM GR-CP	12/89
<i>A. gramineum</i>	Charco del Lobo, Almería. ESPAÑA	JBM GR-CH	12/89
<i>A. gramineum</i>	El Barranquete, Almería. ESPAÑA	JBM GR-EB	12/89
<i>A. gramineum</i>	Cerro de San Cristóbal, Almería. ESPAÑA	JBM GR-SC	12/89
<i>A. gramineum</i>	El Solanillo, Almería. ESPAÑA	JBM GR-ES	12/89
<i>A. gramineum</i>	Cerro de los Lobos, Almería. ESPAÑA	JBM GR-CL	12/89
<i>A. gramineum</i>	Los Molinos, Almería. ESPAÑA	JBM GR-LM	12/89
<i>A. gramineum</i>	Playas de Monsul, Almería. ESPAÑA	JBM GR-PM	12/89
<i>A. gramineum</i>	Zonas Áridas, Almería. ESPAÑA	JBM GR-ZA	12/89
<i>A. gramineum</i>	Aïn Harrouda. MARRUECOS	JBM GR-AH	12/90
<i>A. gramineum</i>	Cap Beddouza. MARRUECOS	JBM GR-CB	12/90
<i>A. gramineum</i>	Casablanca. MARRUECOS	JBM GR-CA	12/90
<i>A. gramineum</i>	Oualidia. MARRUECOS	JBM GR-OU	12/90
<i>A. gramineum</i>	Safi. MARRUECOS	JBM GR-SA	12/90
<i>A. hierrense</i>	Costas del Mazo. La Palma, Islas Canarias. ESPAÑA	JBM HI-LP	01/90
<i>A. hierrense</i>	Dehesa del Sabinar. El Hierro, Islas Canarias. ESPAÑA	JBM HI-HI	01/90
<i>A. hierrense</i>	La Gomera, Islas Canarias. ESPAÑA	JBM HI-GO	11/90
<i>A. palaestinum</i>	Desierto de Dimona. ISRAEL	JBM PA-DI	02/90
<i>A. palaestinum</i>	Beit Shean Valley. ISRAEL	JBM PA-BS	02/90
<i>A. psammophilum</i>	Caleta de Famara. Lanzarote, Islas Canarias. ESPAÑA	JBM PS-LA	11/90
<i>A. psammophilum</i>	Corralejo. Fuerteventura, Islas Canarias. ESPAÑA	JBM PS-FU	11/90
<i>A. rechingeri</i>	Elafonisos, Creta. GRECIA	JBM RE-EL	06/91
<i>A. wyssianum</i>	Essaouira. MARRUECOS	JBM WY-EA	03/03
<i>A. wyssianum</i>	Figuig. MARRUECOS	JBM WY-FI	12/89
<i>A. wyssianum</i>	Er Foud. MARRUECOS	JBM WY-EF	02/92
<i>A. wyssianum</i>	Fonts Bleus de Maski. MARRUECOS	JBM WY-FB	11/92
<i>A. wyssianum</i>	Aïn Ouarka. ARGELIA	JBM WY-AO	04/90
<i>A. wyssianum</i>	Taghit - Igli. ARGELIA	JBM WY-TI	04/90
<i>A. wyssianum</i>	Nefta - Azova. TUNEZ	JBM WY-N1	01/91
<i>A. wyssianum</i>	Nefta - Mearou. TUNEZ	JBM WY-N2	01/91

Tabla C (cont.)

Sudáfrica Occidental

<i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i>	Ctra. Clanwilliam-Wuppertal. Km 10. 3219AA WUPPERTAL.	JBM ALBA-PK	08/94
<i>A. austrocapense</i>	Camino al Cabo de Buena Esperanza. 3418AC SIMONSTOWN.	JBM AUST-GH	07/94
<i>A. austrocapense</i>	Wheal's Point. Reserva de Cape Point. 3418AD SIMONSTOWN.	JBM AUST-WP	07/94
<i>A. bellum</i>	Ctra. Steinkopf a Vioolsdrift. Km 40. 2817DC VIOOLSDRIF.	JBM BELL-VI	08/94
<i>A. burchellii</i> subsp. <i>burchellii</i>	Ctra. Worcester a Touwsrivier, cerca de Hexrivierpass. 3319BC WORCESTER.	JBM BURC-HX	07/94
<i>A. burchellii</i> subsp. <i>pulchrum</i>	Ctra. Calvinia a Ceres, a 7 km del desvío a Kreitzberg. 3119DA CALVINIA.	JBM BURC-CA	07/94
<i>A. burchellii</i> subsp. <i>pulchrum</i>	Reserva de flores de Nieuwoudtville. 3119AA CALVINIA.	JBM BURC-NI	07/94
<i>A. capense</i>	Ctra. Malmesbury a Hopefield. Km 49. 3318AB CAPE TOWN.	JBM CAPE-HO	07/94
<i>A. ciliolatum</i>	Silverhill Seed, nursery. Kenilworth, CAPE TOWN.	JBM CILI-VS	07/98
<i>A. circinatum</i>	Ctra. Springbok a Nababeep. 100 m. 2917DB SPRINGBOK.	JBM CIRC-NB	08/94
<i>A. circinatum</i>	A 3 km W de Springbok. 2917DB SPRINGBOK.	JBM CIRC-SB	08/94
<i>A. cuspidatum</i>	Ctra. Calvinia a Ceres, a 7 km del desvío a Kreitzberg. 3119DA CALVINIA.	JBM CUSP-CA	07/94
<i>A. cuspidatum</i>	Cerca de Montagu-Badskloof. En la ladera W del Gorgo. 3320CD MONTAGU.	JBM CUSP-MO	07/94
<i>A. dregei</i>	Ctra. Clanwilliam-Wuppertal. Km 28. 3219AA WUPPERTAL.	JBM DREG-PK	08/94
<i>A. eghimocymbion</i>	Ctra. N-7 en el paso de Piketberg a Citrusdal. 3218DB CLANWILLIAM.	JBM EGHI-CI	07/94
<i>A. eghimocymbion</i>	Ctra. Clanwilliam-Wuppertal. Km 28. 3219AA WUPPERTAL.	JBM EGHI-PK	08/94
<i>A. hantamense</i>	Ctra. Calvinia a Ceres, a 7 km del desvío a Kreitzberg. 3119DA CALVINIA.	JBM HANT-CA	07/94
<i>A. henssenianum</i>	Ctra. Eksteenfontein a Modderfontein, primera curva. 2817CC VIOOLSDRIF.	JBM HENS-EK	08/94
<i>A. huntleyi</i>	Ctra. Springbok a Port Nolloth, a 14 km de la primera entrada a Eksteenfontein. 2917AD SPRINGBOK.	JBM HUNT-EK1	08/94
<i>A. huntleyi</i>	Ctra. Springbok a Port Nolloth, a 20 km de la primera entrada a Eksteenfontein. 2917AD SPRINGBOK.	JBM HUNT-EK3	08/94
<i>A. irroratum</i>	Ctra. Springbok a Port Nolloth, a 6 km de la primera entrada a Eksteenfontein. 2917AD SPRINGBOK.	JBM IRRO-EK	08/94
<i>A. irroratum</i>	Ctra. Springbok a Port Nolloth, a 15 km de la primera entrada a Eksteenfontein. 2917AD SPRINGBOK.	JBM IRRO-EK2	08/94
<i>A. irroratum</i>	Ctra. Eksteenfontein a Modderfontein, primera curva. 2817CC VIOOLSDRIF.	JBM IRRO-EK6	08/94
<i>A. irroratum</i>	Camino Bitterfontein a Kliprand. 3018CB KAMIESBERG.	JBM IRRO-KA	08/94
<i>A. irroratum</i>	Ctra. Vredental a Koekenaap, a 100 m de la estación de tren. 3118BC VANRHYNSDOR.	JBM IRRO-KW	08/94
<i>A. irroratum</i>	Vanrhynspass. 3119AC CALVINIA.	JBM IRRO-VP	07/94
<i>A. irroratum</i>	Ctra. Vrendental a Vanrhynsdorp. Km 13. 3118AD VANRHYNSDOR.	JBM IRRO-VY	07/94
<i>A. poeltianum</i>	Ctra. Springbok a Nababeep. 100 m. 2917DB SPRINGBOK.	JBM POEL-NB	08/94
<i>A. poeltianum</i>	Ctra. Springbok a Concordia. 2917DB SPRINGBOK.	JBM POEL-CO	08/94
<i>A. poeltianum</i>	Camino de tierra a 5 km de Steinkopt dirección Springbok. 2917DC SPRINGBOK.	JBM POEL-ST	08/94
<i>A. villosum</i>	A 1 km S d'Eksteenfontein. 2817CC VIOOLSDRIF.	JBM VILL-EK	08/94
<i>A. villosum</i>	A 3 km S de Steinkopf, camino paralelo a la N-7. 2917DC SPRINGBOK.	JBM VILL-ST	08/94
<i>A. walteri</i>	Camino de tierra a 5 km de Steinkopt dirección Springbok. 2917DC SPRINGBOK.	JBM WALT-ST	08/94

Tabla C (cont.)

Sudáfrica Oriental

<i>A. albanense</i> subsp. <i>albanense</i>	Boesmanspoort, Sidbury. 3326AB GRAHAMSTOWN.	JBM ALBA-SW	09/00
<i>A. austrocapense</i>	Cape Recife. 3325DC SKOENMAKERSKOP.	JBM AUST-CR	09/00
<i>A. austrocapense</i>	Sardinia Bay. 3325DC SKOENMAKERSKO.	JBM AUST-SB	09/00
<i>A. decipiens</i>	Santa Lucia Estuary. 2832BB MTUBATUBA.	JBM DECI-SL	09/00
<i>A. leistneri</i>	Bloemfontein Botanic Garden. 2926AA BLOEMFONTEIN.	JBM LEIS-BG	05/00
<i>A. leistneri</i>	Bloemfontein Botanic Garden. 2926AA BLOEMFONTEIN.	JBM LEIS-BL	05/00
<i>A. longipes</i>	13 km desvio ctra. Addo-Zuurberg. 3325CC PORT ELIZABETH.	JBM LONG-ZU	09/00

Namibia

<i>A. asteroides</i>	40 km de Gochas hacia Twee Rivier. 2518AD TSES.	JBM ASTE-GO	05/01
<i>A. asteroides</i>	Twee Rivier. 2519BB KOES.	JBM ASTE-TW	05/01
<i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	Great Gamsberg, Nauchas. 2316BA NAUCHAS.	JBM MELA-GA	05/01
<i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	Granja Okabiruru, Otjosondu. 2117BD OTJOSONDU.	JBM MELA-OT	05/01
<i>A. roseum</i>	Gross-Barmen, Okahandja. 2216AD OTJIMBINGWE.	JBM ROSE-FB	05/01

Outgroups

<i>Alstroemeria aurantiaca</i>	Jardín Botánico de Valdivia. CHILE.	JBM ALS-AUR	05/95
<i>Baeometra uniflora</i>	3418AB Simonstown. SUDÁFRICA.	JBM BAE-UNI	11/94
<i>Bulbocodium vernum</i>	Huesca. ESPAÑA.	JBM BUL-VER	11/95
<i>Colchicum lusitanum</i>	Cádiz. ESPAÑA	JBM COL-LUS	10/97
<i>Gloriosa superba</i>	Jardín Botánico Marimurtra. Blanes, Girona. ESPAÑA. (origen Sudafricano)	JBM GLO-SUP	03/98
<i>Merendera androcymbioides</i>	Málaga. ESPAÑA.	JBM MER-AND	03/98
<i>Merendera filifolia</i>	Mallorca. ESPAÑA.	JBM MER-FIL	10/92
<i>Merendera montana</i>	Huesca. ESPAÑA.	JBM MER-MON	07/94
<i>Onixotis stricta</i>	Silverhill Seed, nursery. Kenilworth, Ciudad del Cabo. SUDÁFRICA	JBM ONI-STR	01/97

Presentación del material analizado.

NORTE DE ÁFRICA E ISLAS CANARIAS



A. gramineum



A. hierrense



A. palaestinum



A. psammophilum



A. rechingeri



A. wyssianum (blanco)



A. wyssianum (rosa)



A. wyssianum (Essaouira)

SUDÁFRICA OCCIDENTAL



A. albanense subsp. *clanwilliamense*



A. austrocapense



A. bellum



A. burchellii subsp. *burchellii*



A. burchellii subsp. *pulchrum*



A. capense



A. ciliolatum



A. circinatum

SUDÁFRICA OCCIDENTAL (cont.)



A. cuspidatum



A. dregei



A. eghimocymbion



A. hantamense



A. henssenianum



A. huntleyi



A. irroratum



A. poeltianum

SUDÁFRICA OCCIDENTAL (cont.)



A. villosum



A. walteri

SUDÁFRICA ORIENTAL



A. albanense subsp. *albanense*



A. leistneri



A. longipes

NAMIBIA



A. asteroides



A. melanthioides



A. roseum

Capítulo 1

Características biológicas de las especies de
Namibia y Sudáfrica oriental

1.1 INTRODUCCIÓN

El presente capítulo se ha realizado con la intención de cubrir dos áreas de distribución de este género, Namibia y Sudáfrica oriental (con sus especies correspondientes), que no habían sido objeto de detallados estudios hasta el momento. Al iniciar el trabajo, la única información que se tenía de estas especies era el protólogo de su morfología, la mayoría de ellos en latín y algunos realizados en el siglo XIX. Por ello se consideró interesante estudiar las características biológicas de estas especies, describiendo su morfología, su biología reproductiva y sus características vitales, tal y como se había realizado en las anteriores tesis del J.B.M. con las especies del norte de África y de Sudáfrica occidental del género *Androcymbium*.

1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Entre los años 1994 y 2001 se realizaron dos expediciones a Namibia y una larga expedición a la zona central de Sudáfrica (Orange Free State, Lesotho y Kwazulu - Natal hasta la frontera de Mozambique), muestreando así un número significativo de las especies de toda esta parte oriental del sur de África. Las nuevas especies recogidas (siete en total), son la parte original de taxa estudiados en esta tesis, tanto en su estudio morfológico como de sus características vitales. Todas la especies recolectadas fueron cultivadas bajo las mismas condiciones en los invernaderos de investigación del JBM desde su fecha de recolección hasta la actualidad.

1.2.1 Condiciones de cultivo

Los bulbos fueron plantados en una mezcla de arena de sílice y substrato vegetal (en proporción 2/3 : 1/3) cribada para un diámetro de 5 mm. Para el riego se utiliza agua de lluvia recogida en un depósito del invernadero y se realiza desde finales de Septiembre hasta principios de Abril. Desde Septiembre hasta que emerge el individuo, el riego se realiza con manguera tipo "lluvia".

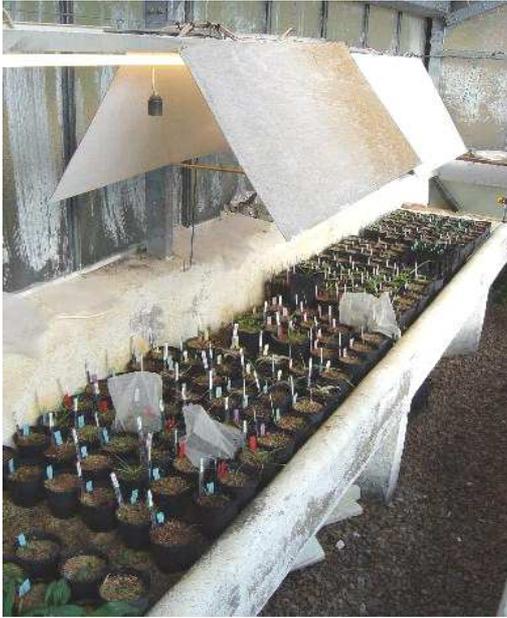


Fig. 1.1: sistema de iluminación del invernadero

Una vez ha emergido el individuo y hasta Abril, se riega mediante tubo exudante, de forma que el agua es captada por las raíces sin necesidad de mojar al individuo. Debido a que el fotoperiodo es mas largo en Sudáfrica oriental y Namibia que en nuestras latitudes, se utilizó luz artificial hasta las 19:30h desde Noviembre hasta Abril (Fig. 1.1).

1.2.2 Mediciones morfológicas

Se realizaron 15 medidas relacionadas con las características florales y cuatro con las características foliares (Tabla 1.1). Las medidas morfológicas se tomaron de plantas en cultivo, ya que en trabajos previos del J.B.M. (Pedrola-Monfort 1993; Membrives 2000) se ha comprobado que las medidas tomadas de *Androcymbium* en cultivo y de las tomadas en individuos de pliegos de herbario, no difieren significativamente. Por ello, se han estandarizado las medidas de hojas y las florales a la antesis, así como las medidas de cápsulas, semillas y cormos a la senectud total de la planta.

1.2.3 Biología reproductiva

1.2.3.1 COCIENTE POLEN/OVULOS (P/O)

Según Cruden (1977) se puede predecir el tipo de sistema reproductivo de la especie en función del valor del cociente P/O. La cantidad de polen por flor se calculó para tres individuos por población a partir de una única antera diluida en 1 o 2 ml de agua jabonosa. El recuento se realizó en una cámara de Fusch-Rosenthal (Braubrand) a partir del número de granos de polen en cada una de las dos cuadrículas con un volumen de $3,2 \text{ mm}^3$ ($0,0625 \text{ mm}^2 \times 0,200 \text{ mm}$). El recuento de óvulos por flor se realizó

directamente bajo la lupa binocular a partir de tres cápsulas inmaduras por cada especie.

Tabla 1.1: biometrías realizadas de los caracteres florales y foliares de las especies recolectadas en Namibia y Sudáfrica oriental

Carácteres florales	Caracteres foliares
Longitud desde el extremo superior del nectario hasta el extremo del tépalo	Longitud de los nomófilos
Longitud desde el extremo superior del nectario hasta la base del tépalo	Anchura de los nomófilos
Longitud desde el extremo superior de la antera hasta el extremo superior de tépalo	Longitud de los hipsófilos
Anchura del tépalo a la altura del extremo superior del nectario	Anchura de los hipsófilos
Anchura del tépalo a la altura del final de la antera	
Longitud del estambre (sin antera)	
Longitud de la antera	
Anchura de la antera	
Longitud del estilo	
Longitud de la cápsula	
Anchura de la cápsula	
Anchura del carpelo	
Anchura del cormo	
Longitud del cormo	
Diametro de las semillas	

1.2.3.2 SISTEMA DE REPRODUCCIÓN SEXUAL

La terminología utilizada para estudiar el comportamiento sexual de las especies fue la descrita por Richards (1986), que considera partenogénesis cuando existe maduración de las semillas sin fecundación, autogamia en los casos que el organismo es autocompatible y xenogamia cuando la fecundación solo es viable a partir de material genético de diferentes gametos, y por tanto, los individuos son autoincompatibles. Las pruebas reproductivas se realizaron, siempre que fue posible, en un mínimo de tres individuos por población (Fig. 1.2). Los experimentos para averiguar el comportamiento reproductivo fueron:

(i) Comprobación de la partenogénesis: se emascularon las flores antes de la anthesis y se taparon las plantas individualmente con bolsas de tul para evitar la entrada de polinizadores.

(ii) Comprobación de la autogamia natural: se taparon los individuos con bolsas de tul sin emasculas las anteras para comprobar si la flor podía autofecundarse utilizando mecanismos propios.

(iii) Comprobación de la autogamia artificial: algunas especies pueden presentar un sistema de fecundación autocompatible pero pueden existir mecanismos temporales o espaciales que impidan la autopolinización natural. Para saber si las poblaciones eran autocompatibles, se seleccionaron individuos y se polinizaron artificialmente con su propio polen durante los días de floración. Estos individuos se taparon con bolsas de tul.

(iv) Comprobación de la xenogamia: se polinizó artificialmente el estigma de una flor emasculada con el polen de la flor de otro individuo distante geográficamente en la población natural para evitar problemas de consanguinidad. Los individuos receptores del polen se taparon con bolsas de tul.



Fig. 1.2: individuos de *Androcymbium* tapados con bolsas de tul para las pruebas de biología reproductiva.

El seguimiento de los experimentos se realizó cada 1-2 días desde el momento de la antesis y durante todo el periodo de floración.

1.2.3.3 REPRODUCCIÓN VEGETATIVA

El cormo del género *Androcymbium* se renueva en cada ciclo biológico. El cormo presenta dos brotes activos que se denominan brote de renovación y brote apical o de reproducción vegetativa (Fig. 1.3). La emergencia de la planta en cada ciclo biológico se produce a partir del brote de renovación, y es en este punto donde se genera el nuevo cormo que substituye al del año anterior. En muchas especies se genera un segundo cormo que proviene de reproducción vegetativa. La emergencia de la división vegetativa y la formación del futuro cormo duplicado se da en el brote apical (o brote de reproducción vegetativa). El brote apical y el brote de renovación están dispuestos de forma opuesta en el cormo. El porcentaje de individuos que presentaron reproducción vegetativa se contabilizó después de dos años de cultivo.

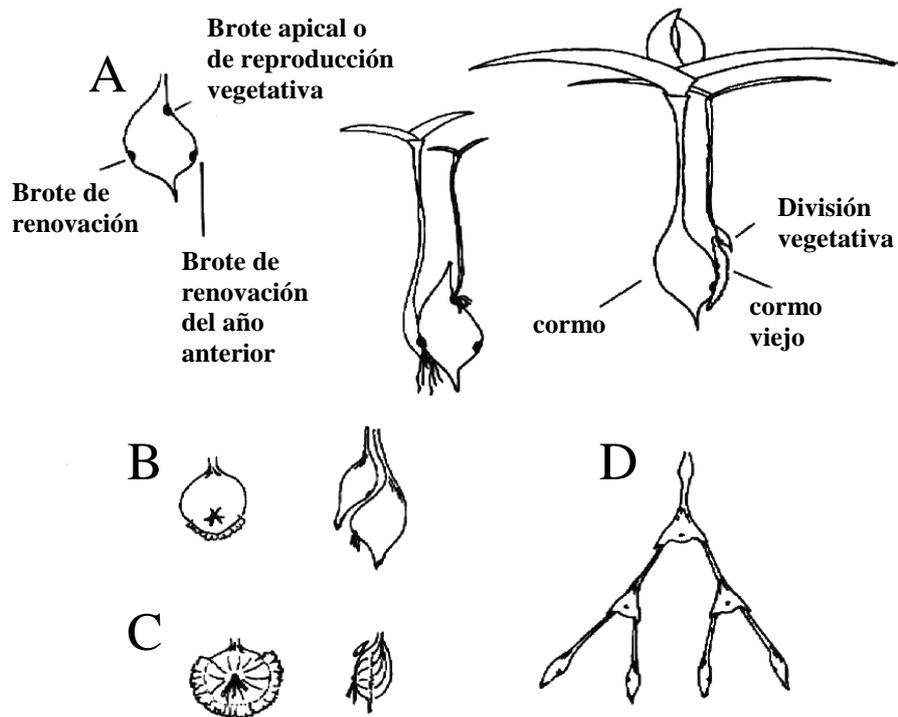


Fig. 1.3: A. Proceso de división vegetativa en el género *Androcymbium*. B. División vegetativa donde se genera un cormo de tamaño medio. C. División vegetativa donde se genera un cormo pequeño. D. División vegetativa en red dicótoma.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Especies recolectadas en Namibia

Androcymbium roseum. Engl.1889, Bot. Jahrb. Syst.10 :282

Typus: Namibia-2216BB (Otjimbingwe). Distr. Okahanda: Hereroland, *in lapidosis prope fontem thermalem Barmem* [Gross-Barmen=Groot-Barmen], Mayo 1886 fl., MARLOTH 1360 (†B holo.).



Distribución: Estepas tropicales de Namibia, Angola, Zimbabwe, Botswana, Zambia y probablemente llega hasta el sur de Burundi (no es conocida hasta el momento en Sudáfrica).

Recolección: En mayo de 2001 se recolectó una muestra poblacional (9 individuos) en la localidad tipo “Fuentes termales de Barmen” (Otjimbingwe, Distr. Okahandja, 2216BB, oeste de la ciudad de Okahandja), sin flor, habitando en zonas

salinas y suelos arenoso-limosos, entre las rocas del cauce de un riachuelo con aguas muy calientes (60°C).

Medidas y observaciones taxonómicas: Para esta descripción se tomaron los datos de la muestra en invernadero de esta población (Fuentes de Barmen) (ROSE-FB: 5 individuos).

Descripción: *Hierba con cormo perenne*; hábitat tipo en roseta basal. *Cormo* ovoide, diámetro de (1,7) cm.; túnicas coriáceas de color marrón oscuro. *Tallos* erectos enterrados en el suelo. *Catafilo* blanco-verdoso que sobresale de la tierra <1 cm long., de textura papirácea en la senescencia. *Hojas* alternas en disposición helicoidal a lo largo del tallo; amplexicaules y muy anchas en la base, vaginato-lanceoladas o vaginato-lineares, indumento del margen con papilas, ápice agudo, sección hoja en V, coloración verde brillante. *Nomófilos*, (18) 20 cm. long x (0,45) 0,6 cm. de anchura, indistinguibles en forma, coloración y textura de los hipsófilos (10) 11,8 cm. long. x (0,7) 1,3 cm. *Flores* subsésiles (1-20 flores por individuo). *Perianto* 5,0 cm. ancho en forma de recipiente calceolar, envuelto completamente por los hipsófilos (forma sólo conocida también en *A. asteroides* y *A. leistneri*); tépalos ovato-lanceolados, blanco-rosados o rojizos; lámina plana acuminada al ápex, (13,5) 14,0 mm. long.; uña plana sin aurículas (7,8) 10 mm. long. *Estambres* insertos; filamentos verdes o translucidos, (4,0) 6,0 mm. long.; antera dorsifixa e introsa (2,3) 3,2 mm. long. x (1,3) 1,7 mm. anchura, coloración violácea. *Nectario* poco más ancho que la base del filamento, cilíndrico, verde-amarillento. *Ovario* subgloboso; estilo triangular-cilíndrico 5 (5,5) 6,0 mm. long; estigma capitato-clavato, 0,5 mm. long, translucido con papilas, húmedo. *Cápsula* ovoide, 5,3 (6,3) 7,2 mm. de anchura, de consistencia papirácea en la senectud, dehiscencia sólo observada en el 1/3 del ápex capsular, abertura septicida; semillas globosas de color oscuro 1,2 (2,2) 1,8 mm. diámetro; testa con células romboidales marrón oscuro; rafe inconspicuo. Presencia de idioblastos en hojas, tépalos y cápsula. Número cromosómico: n = 18.

Biología reproductiva: polen por flor 243.000 (287.700) 332.400; óvulos por flor 36 (37); relación polen/óvulos (P/O) 7.776; Sistema reproductivo según Cruden (1977): xenogamia obligada. Semillas: autogamia natural (8); autogamia artificial (18). No se realizaron pruebas de fecundación cruzada porque solo han florecido tres individuos.

Sistema reproductivo autocompatible. Porcentaje de individuos con reproducción vegetativa: 66,67%.

Cultivo: La experiencia de casi cuatro años de cultivo indica requerimientos similares a las especies del norte de África pero con una necesidad mayor de insolación. Para ello, se instalaron unos sistemas de iluminación artificial (Fig. 1.1). Al ser una especie típica tanto de lluvias de verano como de lluvias de invierno de las zonas subtropicales de África austral, su emergencia se retrasa varios meses respecto a las especies del norte de África.

En cultivo sin embargo, su emergencia responde mas a la cantidad y al tiempo de hidratación de los cormos. Se puede llegar a conseguir su emergencia a base de abundante riego en Noviembre, llegando a florecer en el mes de Enero y a fructificar a finales de Febrero en nuestros invernaderos. Suelen finalizar su ciclo biológico a partir del mes de Abril (Tabla 1.2). Las especies del norte de África emergen a partir de Octubre en nuestros invernaderos, de forma semejante al tiempo de su hábitat natural. Estas especies del norte de África que mas prontamente emergen son *A. gramineum*, *A. palaestinum* y *A. rechingeri*, y con un poco mas de retraso *A. wyssianum*, *A. hierrense* y *A. psammophilum*.

Se observó, en estos cuatro años, cierta dormancia del cormo entre individuos. Durante su cultivo no ha muerto ningún individuo.

Historia taxonómica: No es hasta la aparición del trabajo de Engler (1889), cuando se describe por primera vez *A. roseum* en Hereroland (actualmente este territorio comprende la parte norte de Namibia y sur de Angola). La localidad tipo es "Fuentes termales de Barmen" y el recolector, Marloth, recoge esta muestra de individuos en flor en Mayo de 1886 (otoño austral). Precisamente es en la localidad tipo donde se recolectó esta especie en Mayo de 2001 para traerla al JBM. Engler (1889) se da cuenta que es muy similar a *A. gramineum* y comenta su inclusión en la sección *Erythrosticktus* (Schltdl.). En Durand & Schinz (1898), aparece *A. roseum* de Namibia como especie diferenciada del *A. gramineum* de África boreal. En Krause (1920), se hace una recopilación de todas las nuevas especies reconocidas del género que asciende a 30 especies. Crea dos secciones dentro del género: las secciones *Cymbanthes* y *Erythrosticktus*, diferenciadas por la forma de la lámina en la base: cucullada o plana

respectivamente. Las especies *A. gramineum*, *A. roseum* y *A. bellum* las incluye en esta última sección (sec. *Erythrosticktus*) en base a la característica de la lámina plana. Posteriormente Roessler (1974) describe las afinidades de *A. roseum* con *A. punctatum* de Baker (1874) y *A. gramineum* de Cavanilles (1801) y con las nuevas variedades ordenadas por Maire (1934), y sugiere incluir a *A. roseum* dentro de *A. gramineum* (Cav.) McBride. Las localidades recopiladas por Roessler (1974) en África austral que incluyen a *A. roseum*, pertenecen a varios distritos de la actual Namibia. En estas localidades citadas por Roessler (1974) hemos distinguido dos taxa: *A. asteroides* y *A. roseum*. La especie *A. roseum* solo lo hemos encontrado en las Fuentes termales de Barmen, mientras que en el resto de localidades citadas hemos encontrado *A. asteroides*. Müller-Doblies & Müller-Doblies (2002) reconocen dos subespecies en *A. roseum*. Una es *A. roseum* subsp. *roseum*, que corresponde al *A. roseum* descrito por Engler (1889), y la otra es *A. roseum* subsp. *albiflorus*, que corresponde al *A. asteroides* de Manning & Goldblatt (2001).

Androcymbium asteroides. J.C. Manning & Goldblatt (2001), *Bothalia*, 31:203.

Typus: Northern Cape, 2922 (Prieska) común en suelos encharcados, 06-05-1928, (-DA), Marloth sub Bryant 13570 (PRE, holo.).

Sinonimia: *Androcymbium roseum* subsp. *albiflorum* (Engl.1889, *Bot. Jahrb. Syst.*10:282). U.M-D., Raus, Weiglin & D.M-D. Müller-Doblies & Müller-Doblies (2002). *Feddes Repert*, 113:7-8, 545-599.

Typus: Sudáfrica, norte de la provincia del Cabo, 3123 CA (Victoria West) Hutchinson, 4,5 km. en la carretera hacia Biesispoort. Suelo llano y pedregoso, 22.07.1980 sfr. Müller-Doblies 80019d and excult. BTU 3499 (holotypus; isotypus: K).

Distribución: Manning y Goldblatt (2001) describen el hábitat de esta especie en pequeñas depresiones formadas por las lluvias de finales de verano u otoñales, en terrenos arcillosos de doleritas. Las localidades estudiadas por Manning & Goldblatt (2001) corresponden a provincias del norte del Cabo, en Sudáfrica (*Victoria West*, *Central Upper Karoo*). Sin embargo, las localidades que nosotros hemos estudiado se encuentran en el Kalahari, en la parte central - este de Namibia (Gochas y Twee Rivier),

en los cauces secos de los ríos Auob y Olifants, y corresponden, en nuestra opinión, a *A. asterorides*. Ampliamos así la distribución de este taxa que hasta ahora se había pensado que sólo se distribuía por Sudáfrica.



Recolección: En mayo de 2001. La población encontrada (unos 200 individuos) en el lecho del río seco Auob, a unos 40 km. de Gochas hacia Tweerivier, en el distrito de Tses (2518) (ASTE-GO), estaba ya en flor a diferencia del *A. roseum* recogido la misma semana en las fuentes termales de Barmen. Esta población muestreada de *A. asteroides* crecía en los aportes recientes de sedimentos del lecho de este río seco en que unas semanas antes habría llovido y transportado una apreciable cantidad de agua. Formaba prados junto a otras especies de bulbosas como *Massonia* sp., bajo el bosque de ribera formado por *Acacia erioloba*. La profundidad del corno enterrado era apreciable, unos 20-25 cm. La otra población (80 individuos) se encuentra en Köes (2519), en la desviación de la carretera C 15 en Tweerivier, separada varios km. de la anterior y en la confluencia con el río Olifants (ASTE-TW). También se encuentra sobre

un terreno limoso-arenoso aunque con mas piedras en el fondo y en prados con muchas mas hierbas que la anterior población.

Medidas y observaciones taxonómicas: Para esta descripción se tomaron los datos de dos poblaciones (ASTE-TW: 4 individuos y ASTE-GO: 12 individuos).

Descripción: *Hierba con cormo perenne; hábitat tipo, en roseta basal. Cormo* ovoide, diámetro de (1,6) cm.; túnicas coriáceas de color marrón oscuro. *Tallos* erectos enterrados en el suelo. *Catafilo* blanco-verdoso que sobresale de la tierra <1 cm long., de textura papirácea en la senescencia. *Hojas* alternas en disposición helicoidal a lo largo del tallo; algo vaginadas y anchas en la base, lanceoladas o lanceoladas-lineares, indumento del margen con papilas, ápice agudo, sección de la hoja en V bien pronunciada, coloración verde glauca. *Nomófilos*, (12,6) 13,3 cm. long. x (0,4) 0,5 cm. de anchura, indistinguibles en forma, coloración y textura de los hipsófilos (6,5) 8,0 cm. long. x (4,7) 8,0 cm. *Flores* subsésiles (1-20 flores por individuo). *Perianto* 10,0 cm. ancho en forma de recipiente calceolar, envuelto completamente por los hipsófilos (forma sólo conocida también en *A. roseum* y *A. leistneri*); tépalos ovato-lanceolados, blanco, blanco-rosados o rosas; lámina plana acuminada al ápex, (10,5) 11,5 mm. long.; uña plana sin aurículas, (5,9) 9,7 mm. long. *Estambres* insertos; filamentos verdes o translucidos, (5,0) 7,5mm. long.; antera dorsifixa e introsa (3,1) 3,5 mm. long. x (1,7) 1,8 mm. de anchura, coloración violácea. *Nectario* poco más ancho que la base del filamento, cilíndrico, verde-amarillento. *Ovario* subgloboso; estilo triangular-cilíndrico 4,2 (7,8) 10,0 mm. long.; estigma capitato-clavato, 0,5 mm. long., translucido con papilas, húmedo. *Cápsula* ovoide de consistencia papirácea en la senectud dehiscencia sólo observada en el 1/3 del ápex capsular, abertura septicida, 5,0 (6,8) 8,6 mm. de anchura; semillas globosa oscuro, 1,7 (2,0) 2,5 mm. de diámetro; testa con células romboidales marrón oscuro; rafe inconspicuo. Número cromosómico = desconocido.

Biología reproductiva: polen por flor 84.360 (100.647) 127.310; óvulos por flor 32 (39) 42; relación P/O 2.581; Sistema reproductivo según Cruden (1977): xenogamia facultativa. Semillas: autogamia natural (56); autogamia artificial (25); fecundación cruzada (20). Sistema reproductivo autocompatible. Porcentaje de individuos con reproducción vegetativa: 0%.

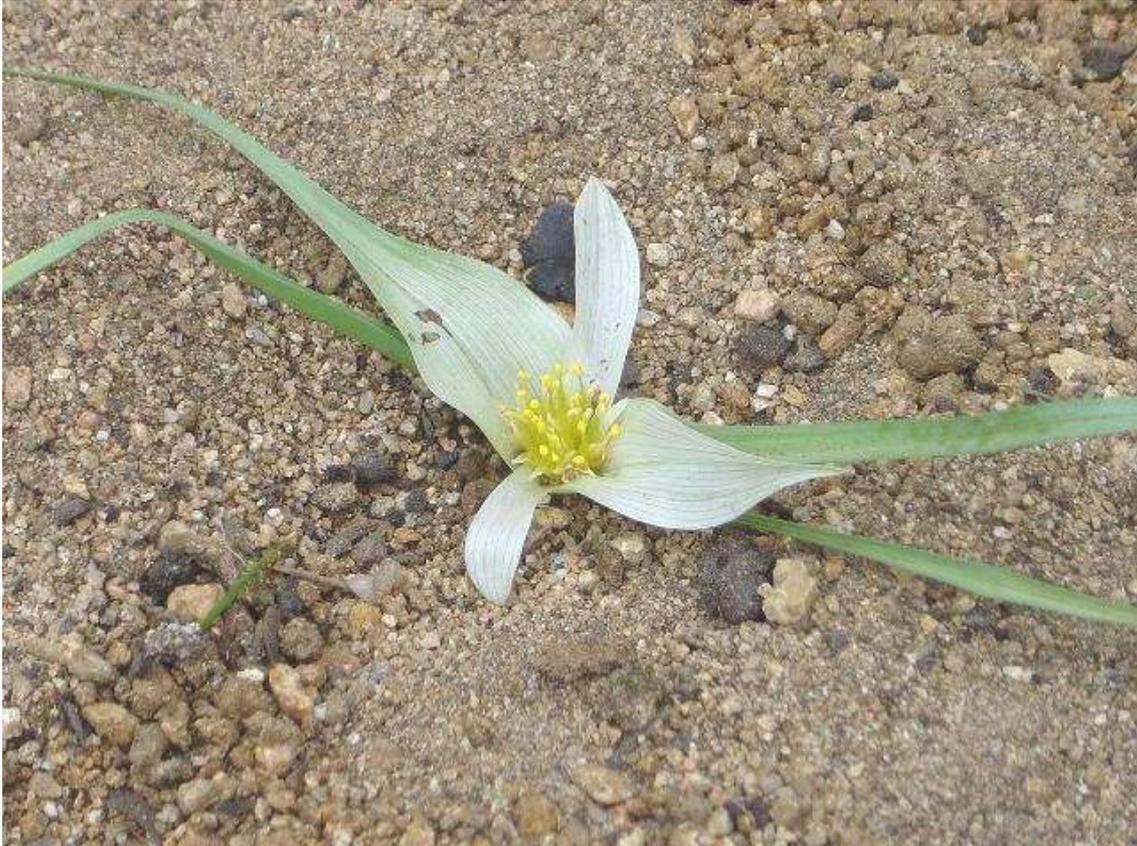
Cultivo: la forma de cultivo es idéntica a la utilizada para *A. roseum*. Emerge antes que *A. roseum*, a principios de Octubre. Su floración es a finales de Noviembre, fructificando en Enero y llegando a la senescencia en Marzo – principios de Abril (Tabla 1.2). También presenta dormancia de cormo. Su cultivo es sencillo, ya que durante estos años no ha muerto ningún individuo.

Nota taxonómica: Aunque el parecido morfológico es sin duda importante, hay determinadas características que diferencian *A. asteroides* de *A. roseum*. En primer lugar, mientras las hojas de *A. roseum* son alargadas estrechas y de un color verde brillante, las hojas de *A. asteroides* son más anchas, acanaladas y de color verde glauco, manteniéndose esta característica en los individuos cultivados. Otras características biométricas estudiadas de las plantas son longitud de la lámina, uña, filamento, estilo y antera, y también las diferencia, siendo en general menores en *A. asteroides*. Sin embargo, cuando Müller-Doblies & Müller-Doblies (2002) propusieron una clave para diferenciar ambas taxa, en nuestra opinión, utilizaron otros individuos de *A. asteroides* de Namibia creyendo que eran *A. roseum*, ya que estos autores presuponen que en Namibia no se encuentra *A. asteroides*.

La flor es una de las características que quizás mas llama la atención. En *A. asteroides* las flores presentan unos tépalos bien compactos y están incluidos en la cazuela que forman los ferófilos casi a ras de suelo, mientras en *A. roseum* la flor tiene sus tépalos menos compactos y mas parecidos a las especies del norte de África. Además, sus tépalos son generalmente de color blanco aunque en algunos individuos tienen cierta coloración blanco-rosada.

Androcymbium melanthioides subsp. *melanthioides* (Willd. Zweiter Jahrgang, 1808)
Müller-Doblies & Müller-Doblies, (1998) Feddes Repertorium 109, 7-8, 551-572.

Typus: Northern Cape, 3020BA, BC, CB, CD/3121AB, AC (Brandevlei & Williston): Sakrivier, [ca. 1000 m.s.m.] LICHTENSTEIN s.n. (B-WILLD. holo!).



Distribución: Tanto en las Montañas de Namibia a partir de 1000 m. de altura como en las del noroeste de Sudáfrica. Probablemente, los individuos que hemos podido ver en pliegos de herbario de las montañas del Transvaal, las del Drakensberg en la actual Lesotho (a 3000 m. de altitud), las del sudoeste de Sudáfrica en Natal, las de Port Elizabet, Kimberley, las del Kilimanjaro (3.500 m de altitud) y las que habitan en las montañas de Etiopia y Somalia, y asignados a *A. melanthioides* sean realmente diferentes taxa, estando bastante de acuerdo con la amplia división de Müller-Doblies & Müller-Doblies (1998).

Recolección: en mayo de 2001 se recolectaron individuos de una población ubicada en las montañas del Great Gamsberg (sur Namibia) Nauchas (2316), a 2347 m. de altitud entre arbustos y gramíneas en lo alto de una meseta, en suelo claramente arcilloso y rico en materia orgánica (MELA-GA). Otra población fue recolectada más al norte, en Okawiruru Farm, Otjosondu (2117), a unos 1000 m. de altitud, también sobre suelos arcillosos, calcáreos y ricos en materia orgánica (MELA-OT).

Medidas y observaciones taxonómicas: Para esta descripción se tomaron los datos de dos poblaciones (MELA-GA; 3 individuos y MELA-OT; 5 individuos).

Descripción: *Hierba con cormo perenne; hábitat tipo, en roseta basal. Cormo* ovoide, diámetro de (1,2) cm.; túnicas coriáceas de color marrón oscuro. *Tallos* erectos enterrados en el suelo. *Catafilo* blanco-verdoso que sobresale de la tierra <3 cm long., de textura papirácea en la senescencia. *Hojas* alternas en disposición helicoidal-dística a lo largo del tallo; ovado-lineares o deltoidea-lineares, indumento del margen liso, ápice agudo, sección hoja en V, coloración verde. *Nomófilos*, (23,4) 25,6 cm. long x (0,6) 1,1 cm. de anchura, indistinguibles en forma, coloración y textura de los hipsófilos (4,3) 5,3 cm. long. x (2,1) 3,2 cm. Generalmente dos grandes hipsófilos de color blanco y textura algo papirácea, forma ovado-lanceolada con estrías y reticulaciones características verdes y 3-6 hipsófilos muy aparentes también pero más estrechos, de la misma coloración y textura. Inflorescencia con forma de un pseudanthio. *Flores* sub-sésiles (1-10 flores por individuo). *Perianto* 10 cm. ancho en forma de recipiente compacto de flores, envuelto por los hipsófilos; tépalos ovado-lanceolados, blancos, translucidos o amarillentos; lámina, generalmente con nerviaciones, aurículas pronunciadas en la base (en raras ocasiones sin aurícula aparente, mas bien plana), aguda o roma al ápex, (7,4) 10,1 mm. long x (4,2) 6,0 mm. de anchura; uña plana, (4,2) 6,5 mm. long. *Estambres* exertos en algunos tépalos y raramente son insertos; filamentos verdes, (5,0) 8,5 mm. long.; antera dorsifixa, semi-extrosa (2,3) 3,9 mm. long. x (1,3) 2,0 mm. de anchura, coloración amarilla, verde-blanquecina, en ocasiones violácea. *Nectario* inconspicuo en la base del filamento, posición ventral y dorsal (probablemente circular), cilíndrico, verde-amarillento-anaranjado. *Ovario* subgloboso; estilo triangular-cilíndrico 3,9 (7,0) 10,2 mm. long; estigma capitato, 0,5 mm. long, translucido con papilas, húmedo. *Cápsula* ovoide de consistencia papirácea, en la senectud dehiscencia septicida, 5,0 (6,5) 8,5 mm. de anchura; semillas globosa de color oscuro (1,5) mm. diámetro; testa con células cuadradas bien definidas, marrón oscuro; rafe inconspicuo. No hay presencia de idioblastos en hojas, tépalos o cápsula. Número cromosómico desconocido.

Biología reproductiva: polen por flor 819.000 (1.306.783) 1.909.880; óvulos por flor 108 (147) 188; relación P/O 8.323. Se observaron algunas anteras sin polen pero los carpelos si contenían óvulos. Sistema reproductivo según Cruden (1977): xenogamia obligada. Semillas: autogamia natural (0); autogamia artificial (17), forma no globosa, irregular; fecundación cruzada (23). Sistema reproductivo: preferiblemente

autoincompatible. Porcentaje de individuos con reproducción vegetativa: 96%. En algunos casos se observaron mas de siete nuevos cormos.

Cultivo: la forma de cultivo que se utilizó es la misma que se ha descrito para *A. roseum* y *A. asteroides*. Suelen emerger a finales de Octubre y florecen a finales de Noviembre. Fructifican en Enero y llegan a la senescencia a mitad de Marzo (Tabla 1.2). Tienen un ciclo biológico muy corto (5 meses), debido seguramente a las condiciones áridas y de extrema calor con las que se encuentran en su medio natural. También presentan dormancia. Su cultivo es sencillo, ya que no se ha muerto ningún individuo en estos años de cultivo.

Nota taxonómica: El tipo original fue descrito por Willdenow en 1808, donde se presenta la primera descripción y lámina que, además, es el tipo del género *Androcymbium*. Baker (1874) incluye en el primer grupo del género a *A. melanthioides*, *A. striatum* y *A. subulatum*. En un posterior trabajo (1879) este mismo autor describe *A. melanthioides* a partir de pliegos de Burkei 2851, Zeyher 1712j, MacOwan 4641 y del Transvaal del Dr. Atherstone. De esta especie, sin embargo, establece tres variedades; var. *acaule* del Transvaal; var. *striatum* de Abisinia y var. *subulatum* de Africa austral y Transvaal. En Thiselton-Dyer et al. (1896-1897), se mantienen las variedades de Baker, a las que añade varias citas de su distribución entre ellas una en Natal, en el Drakensberg. Bentham & Hooker (1883), incluyen a *A. melanthioides* dentro de la sección *Cymbanthes*. Posteriormente Krause en 1920, incluye dentro de este taxa todas las variedades de Baker (1879) incluyendo *A. striatum*. Lo mismo hace Roessler en 1974, aunque describe todas las localidades de Namibia conocidas hasta entonces de *A. melanthioides*. Müller-Doblies & Müller-Doblies, en su revisión de 1998, incluyen dentro de la sección *Androcymbium* a *A. melanthioides* con tres nuevas subespecies: subsp. *australe*, subsp. *melanthioides* y subsp. *transvaalense*, también *A. striatum* y *A. orienticapense*. Esta especie, junto con *A. roseum*, es la mas ampliamente distribuida. Este complejo de *A. melanthioides* necesitaría una profunda revisión sistemática. Una filogenia molecular de las poblaciones y taxa de este complejo nos daría mas luz sobre su posición taxonómica.

1.3.2 Especies recolectadas en Sudáfrica oriental

Androcymbium albanense Schönland in *New and little known plants*, Rec. Albany Museum I:123, 1904.

Typus: Grahamstown, 650 m., Agosto 1903 fl. Albany Museum. Feddes Repertorium II, 183 (1906).

Distribución: Actualmente se conocen poblaciones en *Eastern Cape* (Sudáfrica oriental) desde Grahamstown a Port Elizabeth. La muestra analizada, se recolectó entre *Siddury* y *Eagle's Crag*, cerca de *Bushmen Rivers Poort*, y se encuentra cerca de la localidad típica (Grahamstown). El suelo donde habita es limoso-arcilloso de color claro seco y duro, con piedras sueltas areniscas.



Recolección: El 4 de septiembre del 2000 (invierno austral) entre Siddury y Eagle's Crag, a unos 2 km. antes de la puerta del parque del *Shamwari Game Reserve*, por los alrededores de *Bushmen's Poort*, en un ribazo de *grasslands* (gramíneas), se recolectaron 10 cormos y 15 muestras de hojas para extraer el DNA de una pequeña población (constaba aproximadamente de 30 individuos).

Medidas y observaciones taxonómicas: Para esta descripción se tomaron los datos de diez individuos.

Descripción: *Hierba con cormo perenne*; hábitat tipo, en roseta basal. *Cormo* oblongo, diámetro de (1,02) cm.; túnicas coriáceas de color marrón oscuro. *Tallos* erectos enterrados en el suelo. *Catafilo* blanco-verdoso. *Hojas* alternas en disposición dística a lo largo del tallo; lanceolado-lineares o deltoidea-lineares, indumento del margen papiloso con margen blanco, ápice agudo, sección hoja en V, coloración verde. *Nomófilos*, (10,1) 11,6 cm. long x (0,7) 1,0 cm. de anchura, indistinguibles en forma, coloración y textura de los hipsófilos (2,3) 4,9 cm. long. x (1,3) 1,9 cm. Generalmente dos hipsófilos del mismo color y textura, forma ovado-lanceolada. Los 2 hipsófilos plegados en posición dística, paralelos y encima de los nomófilos. *Flores* sub-sésiles (2-5 por individuo). *Perianto* 1,5-2,0 cm. ancho; tépalos ovado-lanceolados, blancos; lámina blanca, generalmente con nerviaciones, la mediana de color verde, y aurículas transparentes pronunciadas en la base, aguda o roma al ápex, (4,5) 5,6 mm. long x (2,4) 3,1cm. de anchura; uña plana, (6,8) 8,6 mm. long. *Estambres* insertos; filamentos violáceos-marrones, (1,0) 2,4 mm. long.; antera sub-basifixa, introsa (2,1) 2,2 mm. long. x (1,4) mm. de anchura, coloración violácea marrón. *Nectario* violáceo oscuro en posición ventral. *Ovario* subgloboso; estilo cilíndrico 2,0 < (3,5) 5,0 mm. long; estigma capitato, húmedo. *Cápsula* ovoide de consistencia papirácea en la senectud, dehiscencia septicida, 5,5 (7,1) 9,0 mm. de anchura; semillas globosa oscuro 0,9 (1,0) 1,1 mm. diámetro. No hay presencia de idioblastos en hojas, tépalos o cápsula. Número cromosómico desconocido.

Biología reproductiva: polen por flor 332.580 (381.977) 445.310; óvulos por flor 57 (63) 67; relación P/O 6.063. Sistema reproductivo según Cruden (1977): xenogamia obligada. Semillas: autogamia natural (24); autogamia artificial (46); fecundación cruzada (30). Sistema reproductivo: autocompatible. Porcentaje de individuos con reproducción vegetativa: 31%.

Cultivo: la forma de cultivo es idéntica al del resto de especies de Sudáfrica oriental. Su cultivo es sencillo, ya que solo se ha muerto un individuo de los 10 recolectados. Emerge a finales de Octubre – principios de Noviembre y florece en Enero – principios de Marzo. Fructifica en Marzo y entra en senescencia a mitad de

Abril – principios de Mayo (Tabla 1.2). Algunos individuos han presentado dormancia en algunos años.

Nota taxonómica: los individuos recolectados fueron identificados como *A. albanense*, ya que determinados caracteres morfológicos como los hipsófilos en posición dística y paralela a los nomófilos, las medidas de los nomófilos, hipsófilos y tépalos, así como otras características de coloración o textura y las localidades típicas de esta especie (8km de *Grahamstown* hacia *Cradock* (3326 AB), 25-VIII-1981 D. Snijman 451 o Alexandria. *Bushmen's River Poort*, alt: 300 m.; 20-VIII-1954, E.E.A. Archibald 5593), confirmaban esta identificación. La única diferencia respecto a la descripción original de Schönland (1906), era que en esta se describieron los ferófilos glabros y el margen blanco, mientras que los individuos que se recogieron y observamos eran realmente glabros en su superficie, pero tanto en el margen de nomófilos e hipsófilos, así como en el nervio medio del envés presentan papilas evidentes, aunque también se observaba una línea blanca que definía los márgenes de los ferófilos.

Pedrola-Monfort et al. (1999), describían una nueva subespecie llamada *A. albanense* subsp. *clanwilliamense*. El parecido macromorfológico con *A. albanense* era remarcable por la disposición y tamaño de nomófilos e hipsófilos, aunque no de los tépalos ni cápsula. Pronto, mediante análisis más detallados, nos dimos cuenta de que ambos taxa estaban realmente separados, tanto en las filogenias moleculares como en una característica importante como es la reticulación de la superficie del polen que era muy diferente (Pedrola-Monfort com. pers.), lo que nos obligaba a reconsiderar el estatus taxonómico y nomenclatural de esta subespecie que debería tener categoría específica: *A. clanwilliamense*. Müller-Doblies & Müller-Doblies (2002), hacen una importante mención la publicación de Pedrola-Monfort et al. (1999) donde se describe esta nueva subespecie y duda, con toda razón, de nuestra asignación inicial. Posteriormente, con la posibilidad de estudiar el material vivo recogido y cultivado de *A. albanense*, nos apercebimos claramente de la apreciable diferencia entre ambos taxa, lo que corroboraba esta consideración específica de los dos taxa. El problema estriba también en que Müller-Doblies & Müller-Doblies (2002) no han estudiado el material de *A. albanense* y en su tabla de variación de rangos biométricos de las especies de

Androcymbium reconoce no haber medido sus características morfológicas, que damos aquí coincidentes en grado aceptable con la descripción de 1906 de Schönland.

Androcymbium austrocapense Müller-Doblies & Müller-Doblies (1998). Feddes Repertorium 109, 7-8, 551-572.

Typus: Western Cape 3418AB (Simonstown): Cape Point Nature Reserve, 80 m.s.m., 14.08.1984 fl., MÜLLER-DOBLIES 84013a (HOLO: PRE; ISO: B, BTU, G, K, M, NBG.)

Distribución: Por toda la costa desde el cabo de Buena Esperanza (Good Hope Cape) hasta las dunas de la playa cercana a Bathurst en Eastern Cape.



Recolección: El día 2 de septiembre de 2000 (invierno austral) se recolectaron dos poblaciones cerca de Port Elizabeth (Sudáfrica oriental) en las segundas dunas, a menos de 10 m del mar. Habita junto a *Senecio* sp. y diversas gramíneas, sobre fynbos costero y sobre arenas finas de playa con materia orgánica. La primera población fue recolectada en Cape Recife (AUST-CR) (16 muestras de hojas, 16 cormos) y segunda en

Sardinia Bay (AUST-SB) (10 muestras de hojas de individuos en un transecto, 8 cormos).

Medidas y observaciones taxonómicas: Para esta descripción se tomaron los datos de dos poblaciones de Sudáfrica oriental: (AUST-CR: 2 individuos y AUST-SB: 5 individuos). Los individuos de las poblaciones de Sudáfrica occidental se analizaron en una tesis doctoral previa (Membrives 2000).

Descripción: *Hierba con cormo perenne; hábitat tipo, en roseta basal. Cormo* globoso 4,8 (10,3) 19,8 mm. diámetro; túnicas papiraceas duras y lisas de color marrón oscuro. *Tallos* erectos enterrados en el suelo. *Catafilo* membranoso blanco. *Hojas* alternas en disposición helicoidal-dística; lanceolado-lineares, indumento del margen papiloso, ápice acuminado, verdes. *Nomófilos*, (23,8) 35,6 cm. long x (1,1) 2,1 cm. de anchura, amplexicaulas verde brillante, textura similar a los hipsófilos de formas deltoideos formando generalmente dos brácteas envolventes al periantio (3,8) 5,5 cm. long. x (3,6) 4,0 cm. *Flores* sub-sésiles con pedúnculo de hasta 10 mm., (1-16 flores por individuo). *Perianto* 1,4-2,5 mm., envuelto por los hipsófilos; lámina lanceolada, curvada, aurículas translúcidas pronunciadas en la base, (9,3) 13,0 mm. long x (5,5) 8,0 mm. de anchura; uña plana, (9,0) 12,0 mm. long. *Estambres* semi-exertos; filamento verdes, (6,6) 8,5 mm. long.; antera dorsifixa, semi-extrosa (3,9) 5,2 mm. long. x (1,8) 2,3 mm. de anchura, anaranjada. *Nectario* cilíndrico en la base del filamento, púrpura, en posición ventral. *Ovario* subgloboso; estilo cilíndrico 4,5 (6,8) 9,0 mm. long; estigma papiloso, capitato, púrpura, húmedo. *Cápsula* oblonga con alas inconspicuas en el punto medio del carpelo que sigue por los estilos, dehiscencia septicida, 9,5 (15,2) 20,0 mm. x 6,0 (11,6) 15,0 mm. anchura; semillas globosas 1,3 (1,9) 2,5 mm. diámetro; testa rojiza-marrón, rugosa con una capa finísima cuyas células regulares poligonales esta muy bien dibujadas y que se desprende con facilidad en seco en el interior se observa una capa similar en rugosidad a la testa de todas las demás especies de *Androcymbium*. La presencia de esta capa es una característica singular y única en el género, sin carúncula. Presencia abundante de idioblastos en hojas, tépalos y cápsulas. Polen triapertural con ornamentación microreticulada, 16,3 x 27,9 x 18,1 μm . Sistema de reproducción autocompatible. Número cromosómico: $2n = 20$.

Biología reproductiva: polen por flor 965.220 (1.499.648) 2.057.400; óvulos por flor 76 (95) 125; relación P/O 15.786; Sistema reproductivo según Cruden (1977): xenogamia obligada. Semillas: autogamia natural (57); autogamia artificial (67); fecundación cruzada (40). Sistema reproductivo: autocompatible. Porcentaje de individuos con reproducción vegetativa 25%:

Cultivo: su cultivo es bastante complejo. La forma de cultivo es la misma que se ha descrito para las especies anteriores. De los 16 individuos recolectados en Cape Recife solo perduran 2 (12.5%) y de los 10 individuos recolectados en Sardinia Bay permanecen vivos 5 (50%). Son muy sensibles a la acumulación de agua, lo cual provoca una rápida pudrición del cormo. Emergen a finales de Octubre y no florecen hasta principios de Febrero. Su fructificación es a finales de Marzo y llegan a la senescencia a final de Abril (Tabla 1.2). No presentan dormancia.

Nota taxonómica: Cuando se encontraron por primera vez dos poblaciones en la expedición a Sudáfrica Occidental (año 1994), en Simon's Town y en Cape of Good Hope, fue muy difícil asignar este taxa a cualquiera de las descripciones conocidas. No fue hasta el trabajo de Müller-Doblies & Müller-Doblies (1998) en que realmente nos apercebimos de que era una nueva especie. Según cuentan Müller-Doblies & Müller-Doblies (1998), ellos también tuvieron verdaderas dificultades para catalogar esta nueva especie. No lo pudieron resolver hasta que no las compararon con los *typus* de *A. eucomoides* y *A. capense*, que eran las especies probablemente mas semejantes. Muchos autores sudafricanos habían incluido a estas poblaciones de *A. austrocapense* como pertenecientes a alguna de estas dos especies. La diagnosis y la descripción de Müller-Doblies & Müller-Doblies (1998) no dejaban duda sobre la nueva asignación taxonómica como especie bien diferenciada.

Las medidas morfológicas, así como los datos de biología reproductiva, de los individuos analizados de Sudáfrica oriental se ajustan a las obtenidas por Membrives (2000) con los individuos de esta misma especie de Sudáfrica occidental.

Androcymbium decipiens N. E. Br. 1906:29

Typus: Natal.-2931CA (Stranger): Tongaat, 200's.m., 31-7-1895 fl., Miss RICH IN WOOD Herb. Natal. 5764 (K holo., NH, PRCj).

Distribución: *A. decipiens* habita en las tierras bajas de Kwazulu-Natal, muy cerca de la costa (Tongaat y Santa Lucia), al contrario de *A. natalense* que habita en las colinas y montañas de Kwazulu-Natal.

Recolección: El día 2 de Septiembre del 2000 (invierno austral) se recogió un solo ejemplar en condiciones ya de senescencia, pero con algunas partes como hojas y cápsulas verdes para poder extraer DNA y tomar las medidas morfológicas necesarias. Habitaba a 100 m de distancia de la costa, a nivel del mar, en un valle de arenas cubierto en sus zonas mas bajas por pequeñas lagunas de aguas dulces frente a la gran duna costera que corre paralela al mar Índico en Santa Lucia (Kwazulu-Natal), en una zona denominada Iphotwe Trail, en prados compactos de gramíneas y otras bulbosas, sobre arenas oscuras de playa fósil (DECI-SL). Es una zona de difícil acceso por el peligro de encontrarse con cocodrilos y hipopótamos, tal y como indican a lo largo de su recorrido las autoridades del país.

Medidas y observaciones taxonómicas: solo se pudo tomar medidas de un individuo que había entrado ya en fase de senescencia.

Descripción: *Hierba con cormo perenne; hábitat tipo, en roseta basal. Cormo* ovoide, diámetro de (1,1) cm.; túnicas coriáceas muy finas de color marrón oscuro. *Tallos* erectos enterrados en el suelo. *Hojas* alternas en disposición dística a lo largo del tallo; lanceoladas, ápice agudo, sección hoja en V. *Nomófilos*, 10 cm. long x 4 cm. de anchura; hipsófilos 4 cm. long. x 0,8 cm. Generalmente dos hipsófilos, forma lanceolada abiertos. *Flores* sub-sésiles (1-2 flores por individuo). *Perianto* 2 cm., envuelto por los hipsófilos; tépalos lineares; lámina linear, aurículas casi inadvertidas, 8,2 mm. long x 2,8 cm. de anchura; uña plana, 3,2 mm. long. *Estambres* insertos; filamentos, 3,6 mm. long.; antera dorsifixa, extrosa 1,2 mm. long. x 0,6 mm. de anchura. *Nectario* inconspicuo en la base del filamento en posición ventral. *Ovario* subgloboso; estilo cilíndrico, con ala en el punto medio de las línea del carpelo, 5,2 mm. long, se enrosca hacia fuera en la senescencia del individuo observado; estigma capitato, 0,5 mm. long. *Cápsula* ovoide de consistencia papirácea en la senectud, con ala aparente en el punto

medio del carpelo, dehiscencia septicida, 6,3 mm. de anchura; semillas 1 mm. diámetro. Número cromosómico desconocido.

Cultivo: el único individuo que se pudo recolectar murió al año siguiente. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que para el resto de especies anteriormente citadas.

Nota taxonómica: Son muy precisas las observaciones de Müller-Doblies & Müller-Doblies (1998) al separar claramente *A. decipiens* de *A. natalense* y de *A. longipes*, ya que Reid (1993) había incluido a los tres taxa como sinónimos. Además de toda una serie de características morfológicas deducidas a partir de caracteres cuantitativos de pliegos de herbario, aciertan muy bien en la separación fenológica de ambos taxa (cosa que se pudo comprobar *in situ*). *Androcymbium decipiens* florece en Junio-Agosto, mientras *A. natalense* florece entre Septiembre y Enero. También hemos podido comprobar que mientras los hipsófilos de *A. decipiens*, cuyo ejemplar *in situ* ya estaba casi en la senescencia, eran cremos de coloración verde, *A. natalense*, en las fotos de la "Flora de Natal" y otras fotografías estudiadas en el Jardín Botánico de Natal (Pietermaritzburg), tiene los hipsófilos blancos envolviendo al perianto, como *A. ciliolatum* aunque mas cortos, mientras que en *A. decipiens* son abiertos. Existe pues una clara la necesidad de ampliar estos estudios taxonómicos con material vivo de ambas especies.

Androcymbium leistneri Müller-Doblies & Müller-Doblies (1998). Feddes Repertorium 109, 7-8, 551-572.

Typus: Northern Cape. 2824 DA (Kimberley): Kimberley, Nooitgedacht, ca. 10 miles SE of Barkley West, arenas marrones entre rocas dibásicas. 3.800 m.s.m. 17.07.1959 fl Leistner 1969 (holotypus: K!; isotipi: KMG, PRE).

Distribución: Desde el área de Kimberley, en el Norte de la Provincia del Cabo a través del Orange Free State, hasta Lesotho.



Recolección: En fecha 19-20 de Mayo del 2000 se recolectaron dos poblaciones de *A. leistneri*. Una en el mismo Jardín Botánico Nacional de Bloemfontein, en una zona silvestre de los márgenes exteriores, junto a un camino empisado del jardín (muestras de hojas de 18 individuos en un transecto) (LEIS-BG). La otra población se recolectó (9 individuos) en la vertiente sur del Koopie (colina frente al jardín botánico), entre la vegetación natural de *Olea africana* y *Cussonia paniculata* (LEIS-BL).

Medidas y observaciones taxonómicas: Para esta descripción se tomaron los datos de dos poblaciones (LEIS-BL, 1 individuo y LEIS-BG, 3 individuos).

Descripción: *Hierba con cormo perenne*; hábitat tipo, en roseta basal. *Cormo* ovoide, diámetro de (1,3) cm.; túnicas coriáceas de color marrón oscuro. *Tallos* erectos enterrados en el suelo. *Catáfilo* blanco-verdoso que sobresale de la tierra <3 cm. long., de textura papirácea en la senescencia. *Hojas* alternas en disposición helicoidal-dística a lo largo del tallo; lineares o deltoidea - lineares, indumento del margen papiloso, ápice agudo, sección hoja plana, coloración verde. *Nomófilos*, (17,8) 21,2 cm. long x (0,75) 2,0 cm. de anchura, margen hialino sin pelos ni protuberancias, (4-5-6 nomófilos). Generalmente dos grandes hipsófilos de color semejante a los nomófilos, forma

deltoides-ovados, textura papirácea en la senectud (2,3) 2,9 cm. long. x (1,8) 2,3 cm. Inflorescencia en cazuela compacta de flores semejante a *A. roseum*. Flores sub-sésiles (2-7 flores por individuo). *Perianto* 8,0 cm. ancho en forma de recipiente compacto, envuelto por los hipsófilos; tépalos en forma de lanza, blancos; lámina con forma de flecha, generalmente con aparente nerviación central y a veces laterales de intenso color verde, o a veces los laterales purpúreos, aurículas translúcidas pronunciadas en la base y abrazando unos 2-3 mm. a la uña, lámina de (7,8) 9,2 mm. long. x (2,6) 3,0 mm. de anchura; uña cilíndrica, plana ventralmente, (8,5) 10,9 mm. long. *Estambres* insertos en la antesis pero exsertos en la madurez y en la apertura total de los 6 estambres; filamentos marrón-verdoso, (5,8) 7,2 mm. long.; antera dorsifixa, extrosa (4,3) 5,1 mm. long. x (2,1) 2,6 mm. de anchura, coloración roseo-carneo, púrpura-amarillenta. *Nectario* de color púrpura-negro en la base del filamento y como continuación de la uña, posición ventral y dorsal (probablemente circular), forma triangular. *Ovario* subgloboso; estilo triangular-cilíndrico 6,6 (7,7) 8,2 mm. long; estigma púrpura mas intenso hacia el estigma punctiforme, 0,5 mm. long, con papilas, húmedo. *Cápsula* ovoide de consistencia papirácea en la senectud, dehiscencia septicida, 2,2 (4,0) 6,8 mm. de anchura; semillas globosas de color oscuro (2) mm. diámetro; testa con células cuadradas bien definidas, marrón oscuro; rafe inconspicuo. No hay presencia de idioblastos en hojas, tépalos o cápsula. Número cromosómico desconocido.

Biología reproductiva: polen por flor 1.044.540 (4.212.198) 9.207.000; óvulos por flor 114 (129) 143; relación P/O 32.653. Sistema reproductivo según Cruden (1977): xenogamia obligada. Semillas: autogamia natural (0); autogamia artificial (12); fecundación cruzada (21). Sistema reproductivo: preferiblemente autoincompatible. Porcentaje de individuos con reproducción vegetativa: 91%. No se han observado mas de tres nuevos cormos.

Cultivo: la forma de cultivo utilizada es la misma que para las especies anteriormente descritas. Emerge a mitad de Octubre y no florece hasta principios de Enero. Fructifica en Febrero y llega a la senescencia a finales de Marzo (Tabla 1.2). Suelen presentar un año de dormancia de forma intercalada. Su cultivo es sencillo dado que no ha muerto ninguna especie en estos años.

Nota taxonómica: El tipo original fue descrito por Müller-Doblies & Müller-Doblies en 1998, en el que presenta la primera descripción de la especie.

Androcymbium longipes Baker in *Trimen's Journ.* 1874, 246.

Typus: *C. B. Spei in ditone Somerset East, BOWKER*.(HOLO: K).

Distribución: Este de la provincia del Cabo y Lesotho, en altitudes de 1000 a 2500 m.



Recolección: el 3 de septiembre de 2000 (invierno austral) se recolectaron 8 individuos de un población ubicada en Zuurberg (camino de montaña entre Addo Elephant National Park y Paterson, 13 km. hacia Ann's Village). También se recogieron hojas de 10 individuos en un transecto de 50 m. El suelo era arcilloso-limoso con piedras y encharcado por las recientes lluvias. Habita en zonas claras de bosques espesos de *Babiana* sp., *Euphorbia triangularis*, *Rhus* sp. y *Sansiveria hyacinthoides*.

Medidas y observaciones taxonómicas: Para esta descripción se tomaron los datos de siete individuos de la única población recolectada.

Descripción: *Hierba con cormo perenne*; hábitat tipo, en roseta basal. *Cormo* ovoide, diámetro de (1,2) cm.; túnicas coriáceas muy frágiles de color marrón oscuro. *Tallos* erectos enterrados en el suelo. *Catafilo* marron-púrpura que sobresale de la tierra <3 cm long., de textura papirácea en la senescencia. *Hojas* alternas en disposición helicoidal-dística a lo largo del tallo; lineares o lanceolado-lineares, indumento del margen liso, ápice agudo, sección hoja en V, coloración verde. *Nomófilos*, (11,3) 15,0 cm. long x (0,6) 1,2 cm. de anchura, indistinguibles en forma, coloración y textura de los hipsófilos (2,0) 5,0 cm. long. x (0,6) 1,3 cm., ambos verde brillante, generalmente presenta 2 hipsófilos, lanceolados, pero a veces no se observan. *Flores* sub-sésiles (1-4). *Perianto* 3,0 cm. ancho; tépalos lanceolados, (8,7) 10,0 mm. long. x (3,0) 5,0 cm. de anchura, blancos, translucidos; lámina, con aurículas, ápex agudo; uña plana, (7,6) 15,0 mm. long., (estas medidas de la uña son tomadas en la antesis. Al madurar la planta y en la senescencia, la uña crece hasta ser el doble que la lámina, tal y como se cita en su descripción clásica). *Estambres* insertos; filamento púrpura, (3,5) 5,0 mm. long.; antera dorsifixa/basifixa, semi-extrosa (2,2) 2,6 mm. long. x (1,1) 1,3 mm. de anchura, coloración violácea. *Nectario* violáceo en la base del filamento posición ventral. *Ovario* subgloboso; estilo linear (7,8) 11,7 mm. long.; estigma con papilas desde el ápex linealmente hacia la mitad, 1,0-2,8 mm. long., húmedo. *Cápsula* ovoide de consistencia papirácea en la senectud, dehiscencia septicida, 6,0 (9,9) 12,5 mm. de anchura; semillas 1,6 (1,8) 2,0 mm. diámetro; Número cromosómico desconocido.

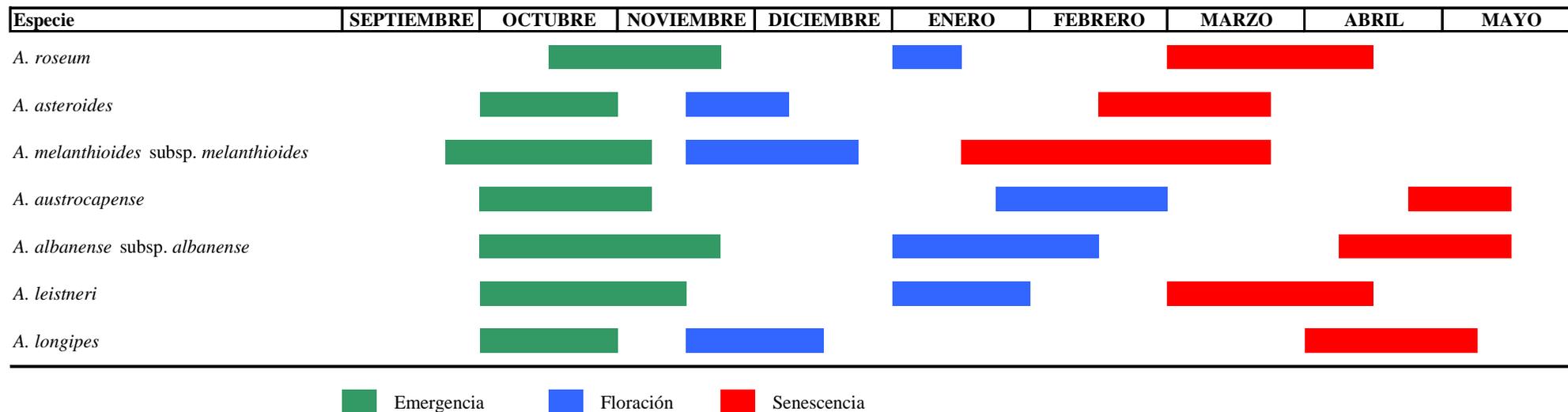
Biología reproductiva: polen por flor 109.310 (128.873) 140.060; óvulos por flor 39 (64) 110; relación P/O 2.013; Sistema reproductivo según Cruden (1977): xenogamia facultativa. Semillas: autogamia natural (24); autogamia artificial (31); fecundación cruzada (49). Sistema reproductivo: autocompatible. Porcentaje de individuos con reproducción vegetativa: 57%.

Cultivo: la forma de cultivo es idéntica al resto de especies de Sudáfrica oriental y Namibia. Durante estos años de cultivo han muerto 2 individuos. Emerge a mediados de Octubre y florece a finales de Noviembre – principios de Diciembre. Su

fructificación es en Febrero y su senescencia durante el mes de Abril (Tabla 1.2). No presentan dormancia.

Nota taxonómica: Su clasificación fue rápida, ya que es la única especie conocida de *Androcymbium* con las uñas de los tépalos tan largas (Müller-Doblies & Müller-Doblies 1998).

Tabla 1.2: fenología de las especies estudiadas de Namibia y Sudáfrica oriental



Capítulo 2

Genética poblacional de las especies de
Namibia y Sudáfrica oriental

2.1 INTRODUCCIÓN

Las poblaciones vegetales no se encuentran distribuidas al azar dentro de las comunidades, sino que se ordenan siguiendo fundamentalmente ciertos patrones determinados que producen una estructuración de los individuos y las poblaciones en el espacio físico. En primer lugar, estos patrones se deben a determinadas características intrínsecas biológicas (tipo de reproducción, síndromes de polinización, apareamiento preferencial) y ecológicas de las especies (interacción fisio-autoecológica con el hábitat o con el resto de organismos de la comunidad), que producen una demografía singular en las poblaciones, ya que de ellas depende tanto las tasas de reproducción como las de mortalidad. En segundo lugar, estos patrones pueden reflejar causas histórico-ambientales, donde los factores estocásticos pueden originar, en determinados casos, un papel determinante (cambios climáticos y orogénicos). El efecto combinado de todos estos factores y causas interactuantes sobre las poblaciones naturales, conformarán su estructura genética (Jain 1990).

El análisis de la estructura poblacional es, por tanto, una pieza clave para conocer la dinámica evolutiva de las especies. Antes de la aparición y popularización de las técnicas aloenzimáticas o de las basadas en el DNA, la descripción de la estructura poblacional presentaba una enorme dificultad, pues era necesario realizar exhaustivos y complicados análisis cuantitativos de aspectos morfológicos en experimentos controlados para eliminar la varianza ambiental. Hoy día, gracias a estas técnicas se dispone de una inmensa cantidad de datos procedentes de muchas especies de organismos. Entre estas técnicas ha sido muy importante, y todavía lo es, la técnica del análisis aloenzimático introducida por Lewontin & Hubby (1966). Recientemente, en la década de los 90, los avances en biología molecular han propiciado la aparición de un gran abanico de técnicas que utilizan el DNA y se basan en la PCR, que han resultado ser muy útiles a la hora de realizar estudios sobre la estructura genética de las poblaciones. Técnicas como el análisis RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (Williams et al. 1990), los AFLP (*amplified fragment length*

polymorphism) (Vos et al. 1995) o los microsatelites o SSRs (*short sequence repeats*) (Wolfe & Liston 1998) nos han servido para obtener una gran cantidad de datos relacionados con la cantidad y distribución de la variabilidad genética de las poblaciones.

En estudios previos con el género *Androcymbium* utilizando la técnica aloenzimática, se ha analizado la estructura genética poblacional de especies distribuidas por el norte de África e Islas Canarias y por Sudáfrica occidental. Mediante estos estudios se han constatado patrones diferentes con respecto a la distribución de la diversidad génica. Así, en las especies del norte de África e Islas Canarias, la mayor parte de la diversidad genética se encuentra “dentro de las poblaciones” (Pedrola-Monfort 1993; Pedrola-Monfort & Caujapé-Castells 1994, 1996), pero en las especies de Sudáfrica occidental una parte importante de esta diversidad genética se encontraba distribuida “entre las poblaciones” (Membrives et al. 2001). Además, en las especies de *Androcymbium*, parece existir una correlación entre la cantidad de variabilidad genética poblacional y el sistema reproductivo, de manera que las especies con sistema reproductivo preferiblemente autoincomplatible presentan valores de variabilidad genética poblacional superiores a aquellas que lo presentan autocompatible (Membrives et al. 2001). De la misma manera, también se pudo constatar en estos trabajos que los niveles de variabilidad genética de las poblaciones no estaba correlacionado con la dinámica evolutiva de estas, tal y se como propone Olmstead (1990).

En este capítulo se ha estudiado la estructura genética poblacional de siete especies descritas en el capítulo 1 y distribuidas por Sudáfrica oriental (*A. albanense*, *A. austrocapense*, *A. leistneri*, *A. longipes*) y Namibia (*A. asteroides*, *A. melanthioides*, *A. roseum*). De *A. decipiens* no se ha podido estudiar su estructura genética poblacional, ya que se solo contábamos con un individuo.

Los objetivos particulares del capítulo son:

(i) Cuantificar la variabilidad genética específica y poblacional, y caracterizar la estructura genética de las especies de Sudáfrica oriental y Namibia del género *Androcymbium* (Colchicaceae).

(ii) Comparar estos resultados con los obtenidos en estudios previos con las especies del norte de África e Islas Canarias y Sudáfrica occidental.

(iii) Comprobar si la cantidad y la distribución de la variabilidad genética de las especies de este género están relacionadas con factores evolutivos o con factores histórico-ambientales.

2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

En vez de los análisis aloenzimáticos utilizados en los anteriores estudios del género *Androcymbium*, en este trabajo hemos utilizado la técnica de los RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*, Williams et al. 1990). El motivo fundamental para no utilizar la técnica aloenzimática en las especies de Sudáfrica oriental y Namibia ha sido que, por su naturaleza endémica y por el hecho de que las poblaciones están formadas por pocos ejemplares, no se consideró ético con las actuales prácticas conservacionistas del J.B.M., recoger un gran número de individuos vivos para cultivarlos en el invernadero de investigación, ya que con ello se habrían diezmando las poblaciones *in situ*. A diferencia de la técnica aloenzimática, donde se necesita abundante material fresco, para realizar los análisis RAPD solo se necesita DNA y con poca cantidad ya es suficiente (10 a 400 ng., Benito et al. 1993; Brown et al. 1993). Por ello, con las hojas recolectadas de los individuos *in-situ* ya es suficiente para extraer el DNA y realizar los análisis.

Los análisis RAPD han sido ampliamente utilizados para evaluar la estructura genética de muchos grupos de plantas que representan una selección diversa de familias y clases como por ejemplo en *Borderea chouardii* (Dioscoreaceae) (Segarra-Moragues et al. 2005); *Brassica oleracea* (Cruciferae) (Lázaro & Aguinagalde 1998); *Campanula microdorta* (Campanulaceae) (Oiki et al. 2001); *Licuala glabra* (Palmae) (Loo et al. 1999); *Oryza glumaepatula* (Gramineae) (Buso et al. 1998); *Prunus mahaleb* (Rosaceae) (Jordano & Godoy 2000); *Tripsacum* (Poaceae) (Li et al. 1999); *Vanda* (Orchidaceae) (Lim et al. 1999). También se han utilizado en plantas para tipificar variedades de cultivo y estimar el grado de divergencia entre ellas, para identificar híbridos, herencias de bandeado, análisis de vinculación y mapeado del genoma.

2.2.1 Muestras analizadas

Los patrones de diversidad genética obtenidos con la técnica RAPD sólo son comparables de forma relativa con los obtenidos con el estudio de los alozimas (Casiva et al. 2002), ya que en términos absolutos de diversidad, los valores son muy

diferentes (Oiki et al. 2001). Por ello, también se analizaron con la técnica RAPD las especies del Norte de África e Islas Canarias, y una especie de Sudáfrica occidental. De esta forma disponíamos de valores de diversidad genética y diferenciación poblacional de las especies del norte de África e Islas Canarias obtenidos con dos metodologías diferentes, pudiendo así interpretar mejor los resultados obtenidos con las especies de Sudáfrica oriental a la hora de compararlos con el de resto de especies ya analizadas. En total hemos analizado con la técnica RAPD los patrones de diversidad genética intra e interpoblacional en 33 poblaciones de 14 especies del género *Androcymbium* (Colchicaceae) que habitan en el Norte de África, Islas Canarias, Sudáfrica occidental, Sudáfrica oriental y Namibia (Tabla 2.1).

Las especies estudiadas del norte de África e Islas Canarias y de Sudáfrica occidental forman parte de la colección científica del J.B.M., y se cultivan desde hace tiempo en su invernadero de investigación (Fig. 2.1). De las especies estudiadas de Sudáfrica oriental y Namibia, solo se recolectaron unos pocos ejemplares para cultivarlos en el invernadero de investigación, ya que no se creyó que fuera ético recoger una gran cantidad de individuos vivos. Por ello, se recogieron hojas *in situ* para extraer DNA y contar con una mayor representación poblacional para los análisis, sin necesidad de diezmar las poblaciones naturales. La recolección de este material se hizo siguiendo un transecto, ya que con este procedimiento se obtiene una muestra representativa de toda la variación presente en la población (Van Noordwijk 1990). Las hojas fueron deshidratadas en origen con gel de sílice para prevenir su degradación.

Todas las muestras analizadas en este capítulo fueron recolectadas entre los años 1989 y 2004.

Tabla 2.1: especies y poblaciones de *Androcymbium* analizadas en este capítulo.

Especie	Localidad	Código	Individuos Analizados
Especies de Namibia			
<i>A. asteroides</i>	2518AD Tses.	JBM ASTE-GO	10
<i>A. asteroides</i>	2519BB Koes.	JBM ASTE-TW	10
<i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	2316BA Nauchas.	JBM MELA-GA	10
<i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	2117BD Otjosundu.	JBM MELA-OT	10
<i>A. roseum</i>	2216AD Otjimbingwe.	JBM ROSE-FB	10
Especies de Sudáfrica oriental			
<i>A. albanense</i> subsp. <i>albanense</i>	3326AB Grahamstown.	JBM ALBA-SW	10
<i>A. austrocapense</i>	3325DC Skoenmakerskop.	JBM AUST-CR	10
<i>A. austrocapense</i>	3325DC Skoenmakerskop.	JBM AUST-SB	9
<i>A. decipiens</i>	2832BB Mtubatuba.	JBM DECI-SL	1
<i>A. leistneri</i>	2926AA Bloemfontein.	JBM LEIS-BG	9
<i>A. leistneri</i>	2926AA Bloemfontein.	JBM LEIS-BL	10
<i>A. longipes</i>	3325CC Port Elizabeth.	JBM LONG-ZU	10
Especies del norte de África			
<i>A. gramineum</i>	Cap Beddouza. MARRUECOS	JBM GR-CB	10
<i>A. gramineum</i>	El Barranquete, Almería. ESPAÑA	JBM GR-EB	9
<i>A. gramineum</i>	Playas de Monsul, Almería. ESPAÑA	JBM GR-PM	10
<i>A. hierrense</i>	La Gomera, Islas Canarias. ESPAÑA	JBM HI-GO	9
<i>A. hierrense</i>	El Hierro, Islas Canarias. ESPAÑA	JBM HI-HI	9
<i>A. hierrense</i>	La Palma, Islas Canarias. ESPAÑA	JBM HI-LP	10
<i>A. palaestinum</i>	Beit Shean Valley. ISRAEL	JBM PA-BS	8
<i>A. palaestinum</i>	Desierto de Dimona. ISRAEL	JBM PA-DI	3
<i>A. psammophilum</i>	Fuerteventura, Islas Canarias. ESPAÑA	JBM PS-FU	8
<i>A. psammophilum</i>	Lanzarote, Islas Canarias. ESPAÑA	JBM PS-LA	8
<i>A. rechingeri</i>	Elafonisos, Creta. GRECIA	JBM RE-EL	9
<i>A. wyssianum</i>	Aïn Ouarka. ARGELIA	JBM WY-AO	6
<i>A. wyssianum</i>	Essaouira. MARRUECOS	JBM WY-EA	8
<i>A. wyssianum</i>	Er Foud. MARRUECOS	JBM WY-EF	9
<i>A. wyssianum</i>	Fonts Bleus de Maski. MARRUECOS	JBM WY-FB	9
<i>A. wyssianum</i>	Figuig. MARRUECOS	JBM WY-FI	9
<i>A. wyssianum</i>	Nefta1. TÚNEZ	JBM WY-N1	9
<i>A. wyssianum</i>	Nefta2. TÚNEZ	JBM WY-N2	8
<i>A. wyssianum</i>	Taghit - Igli. ARGELIA	JBM WY-TI	7
Especies de Sudáfrica occidental			
<i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i>	3219AA Wuppertal.	JBM CLAN-PK	10
<i>A. austrocapense</i>	3418AC Simonstown.	JBM AUST-GH	10
<i>A. austrocapense</i>	3418AD Simonstown.	JBM AUST-WP	10



Fig. 2.1: cultivos de *Androcymbium* en el invernadero de investigación del J.B.M.

2.2.2 Extracción de DNA

La extracción de DNA de los individuos recogidos en Sudáfrica oriental y Namibia se realizó a partir de fragmentos de 1 cm² de las hojas secadas en origen con gel de sílice. La extracción de DNA de los individuos procedentes del invernadero de investigación del J.B.M. (individuos del Norte de África e Islas Canarias y Sudáfrica occidental), se hizo a partir de fragmentos de 1 cm² de hojas frescas. Los trozos de hoja fresca fueron deshidratados con gel de sílice previamente a la extracción. El DNA se extrajo siguiendo el método del CTAB (Doyle & Doyle 1987) con algunas modificaciones (Li et al. 2001). Una vez finalizada la extracción se cuantificaron con el espectrofotómetro GeneQuant II (Pharmacia) la concentración de DNA obtenida, la calidad del DNA (Abs_{260}/Abs_{280}) y la concentración de proteínas. Las muestras con concentración de proteína superior a 0,4 mg/ml fueron descartadas por dar problemas en la amplificación. El DNA fue conservado congelado (-25°C) en tampón T.E. hasta el momento de los análisis.

2.2.3 Marcadores RAPD's

La técnica RAPD está basada en la metodología estándar de la PCR pero utilizando un solo cebador de secuencia arbitraria (Williams et al. 1990). Estos cebadores tienen una longitud de 10 pb y un contenido mínimo del 50% en GC. El hecho que se utilicen cebadores con secuencia arbitraria, hace posible que podamos utilizar esta técnica sin necesidad de tener conocimientos previos de las muestras a analizar.

Para obtenerse un producto de amplificación con un solo primer, deben haber dos secuencias diana idénticas, o muy similares, en zonas muy cercanas en ambas cadenas del DNA, que permitan la hibridación de los cebadores. Aproximadamente el 95% del DNA amplificado mediante RAPD es de origen nuclear, y solo el 5% restante es de origen citoplasmático o mitocondrial (Kazan et al. 1993; Thormann & Osborn 1993).

Antes de iniciar los análisis RAPD se hizo una prueba piloto donde se utilizaron 71 cebadores de 5 series diferentes de Operon™. En función de la claridad de los patrones obtenidos, se eligieron 20 de estos cebadores (Tabla 2.2). Esta selección de cebadores se hizo en función de la claridad de las bandas y no a favor de aquellos que presentaban mayor polimorfismo.

CEBADOR	SECUENCIA (5'-3')
OPC-02	GTGAGGCGTC
OPC-03	GGGGGTCTTT
OPC-05	GATGACCGCC
OPC-06	GAACGGACTC
OPC-08	TGGACCGGTG
OPC-10	TGTCTGGGTG
OPC-18	TGAGTGGGTG
OPC-19	GTTGCCAGCC
OPC-20	ACTTCGCCAC
OPI-01	ACCTGGACAC
OPI-04	CCGCCTAGTC
OPI-13	CTGGGGCTGA
OPJ-06	TCGTTCCGCA
OPU-03	CTATGCCGAC
OPU-06	ACCTTTGCGG
OPU-08	GGCGAAGGTT
OPU-11	AGACCCAGAG
OPU-12	TCACCAGCCA
OPU-14	TGGGTCCCTC
OPU-15	ACGGGCCAGT

Tabla 2.2: cebadores utilizados en el análisis RAPD.

La amplificación RAPD se llevó a cabo para un volumen de 10 µl trabajando a 1x PCR buffer (Bioline), 3,5 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,2 mM de cada dNTP (Bioline), 0,2 µM de primer (Operon), 0,9 U de Taq-polimerasa Biotaq (Bioline) y 50 ng de DNA. Las condiciones de amplificación fueron de 1' a 92°C para activar la Taq-polimerasa, seguidos por 45 ciclos de 10'' a 92°C para desnaturalizar el DNA, 10'' a 35°C para la hibridación de los cebadores, y 1'10'' a 72°C para la elongación,

acabando con un paso de 2' a 72°C. Los fragmentos amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, y los fragmentos se visualizaron con luz ultravioleta en el transiluminador TFX – 20M (Vilber – Lormat). Cada gel fue fotografiado con una cámara digital DC 120 (Kodak) y analizado con el programa Kodak DS 1D v.2.0.3 (Kodak). El peso molecular de los fragmentos amplificados se obtuvo a partir de los marcadores moleculares λ EcoRI – HindIII (DNA molecular weight marker III – Roche) y 250 bp (DNA molecular weight marker XIV – Roche). La longitud de cada una de las bandas del marcador molecular se introdujo en el programa Kodak DS 1D (Kodak), el cual nos calcula el peso molecular de cada una de las bandas de los individuos, comparando las distancias de migración de las bandas del marcador molecular con la de los individuos a analizar.

El principal inconveniente que se le ha atribuido al análisis RAPD es su falta de reproductividad. Penner et al. (1993) encontraron que el factor mas importante para la reproductividad de un análisis RAPD no son las muestras sino el laboratorio: sus reactivos y su maquinaria, siendo la fuente mas importante de variación el termociclador. Nuestro estudio se ha realizado utilizando el mismo termociclador para analizar todas las muestras. Para comprobar la repetitividad de los patrones de bandas, se realizaron diferentes homologias (Rieseberg 1996). Estas consisten en coger diferentes individuos de diferentes especies, de los cuales ya hemos obtenido un patrón de bandas, y volverlos a amplificar. El patrón de bandas de estos individuos re-amplificados es comparado con el patrón obtenido en la anterior amplificación, comprobando así la posible existencia de bandas diferentes. Se hicieron homologias con individuos de todas las poblaciones para asegurar la repetitividad de las bandas. En ningún caso se obtuvieron datos anómalos.

2.2.4 Análisis de datos

Los polimorfismos detectados con RAPD son en general el reflejo de cuatro procesos mutacionales: (i) el aumento de la longitud del fragmento entre las dianas del cebador debido a la inserción de un fragmento grande de DNA traduciéndose en una amplificación negativa de este; (ii) la delección de una de las dianas del cebador,

por lo que no hay producto en la reacción de PCR; (iii) el cambio nucleotídico en la secuencia diana del cebador, lo que también resulta en la falta de producto de PCR; (iv) la inserción o delección de un fragmento pequeño entre las dianas del cebador, lo que provoca un cambio del tamaño del fragmento amplificado en la reacción de PCR y la aparición de nuevos fenotipos RAPD para un mismo locus. Sin embargo, esto último es raramente observado en la práctica (Weising et al. 1995), por lo que los polimorfismos de RAPD se basan principalmente en la presencia-ausencia de los fragmentos amplificados. Como resultado, los datos disponibles de un locus para una población, son el número de individuos con una banda correspondiente a aquel locus y el número de individuos que carecen de esa banda. Sin embargo, la interpretación de los datos de RAPD presenta una serie de problemas más allá de distinguir entre el individuo homocigoto y el heterocigoto. Por un lado, no podemos asegurar que 2 bandas comigrantes representan a un mismo locus, mientras que por otro lado no podemos establecer con seguridad qué bandas representan a caracteres independientes. Debido a estas limitaciones, muchos análisis estadísticos utilizados normalmente en estudios de genética de poblaciones, no se pueden aplicar fácilmente a los datos de RAPD. Así, tampoco podemos saber cuántos alelos por locus tenemos, a no ser que tengamos un conocimiento previo del coeficiente de consanguinidad, ni podemos calcular directamente las frecuencias alélicas de los loci específicos. Generalmente se asume que cada banda representa a un locus diferente y que las bandas compartidas entre individuos corresponden a la misma región genómica amplificada, aunque esta interpretación puede ser errónea cuando analizamos individuos de diferentes taxa (Kosman & Leonard 2005). De hecho, se estima que el 95% de los fragmentos RAPD se comportan como marcadores dominantes, mientras que solo el 5% restante lo hace como codominantes (Williams et al. 1990; Fritsch & Rieseberg 1992).

Las aproximaciones actuales para calcular la diversidad genética y su distribución utilizando marcadores dominantes, implican o bien asumir que el coeficiente de consanguinidad intrapoblacional es conocido, pudiendo calcular así el número de alelos por loci (Lynch & Milligan 1994; Zhivotovsky 1999), o bien tratar los fenotipos de los loci obtenidos como haplotipos y usar índices de similaridad (p.e.

Nei & Li 1979) o distancias Euclideas (Schneider et al. 2000) para describir las divergencias entre los haplotipos y aplicarlas en un análisis estadístico de la varianza molecular (AMOVA: Excoffier et al. 1992; Isabel et al. 1999). Debido a que no conocemos los valores de la consanguinidad intrapoblacional, los datos obtenidos fueron codificados como caracteres binarios creando una matriz de ausencia (0) y presencia (1) de las bandas. De esta manera, los fenotipos moleculares obtenidos de cada individuo fueron transformados en haplotipos.

2.2.4.1 DIVERSIDAD GENÉTICA INTRA- E INTERPOBLACIONAL

Para calcular la diversidad genética en las especies y poblaciones, se utilizaron los índices de Shannon (Lewontin 1972) y de diversidad nucleotídica (Tajima 1983; Nei 1987). El índice de Shannon es interesante porque es poco sensible a la desviación que puede haber en los datos debido a la heterocigosidad no detectada (Gustafson et al. 1999; Maki & Horie 1999). Para calcular el índice de Shannon se utilizó el programa Popgene v.1.32 (Yeh 1997), mientras que para calcular el índice de diversidad nucleotídica se utilizó el programa ARLEQUIN (Schneider et al. 2000).

2.2.4.2 ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR: AMOVA

El análisis de la varianza molecular (AMOVA), es un método similar a otras aproximaciones basadas en el análisis de la varianza de frecuencias génicas, pero teniendo en cuenta el número de cambios nucleotídicos entre los haplotipos. La AMOVA descompone la diversidad genética total en componentes debidas a las diferencias entre los individuos dentro de las poblaciones y a la diferenciación entre las poblaciones. El nivel de análisis jerárquico de nuestro estudio consiste en comparar los niveles de variación entre haplotipos dentro de poblaciones y entre poblaciones. Los valores obtenidos son una medida del nivel de variación que existe entre las poblaciones.

Utilizando el programa ARLEQUIN (Excoffier et al. 1992) para calcular la AMOVA, hemos podido comprobar como se distribuye la diversidad genética en las especies analizadas. Para testar la significación de los valores obtenidos, se utiliza una aproximación no paramétrica que consiste en permutar haplotipos, individuos o poblaciones, entre individuos, poblaciones o grupos de poblaciones (Excoffier et al.

1992). La hipótesis nula de la cual se parte es la no existencia de estructuración poblacional. Las distancias genéticas entre las combinaciones de poblaciones fueron expresadas como valores Φ_{ST} , los cuales son una estima directa de F_{ST} (Excoffier et al. 1992).

2.2.4.3 ESTRUCTURA POBLACIONAL UTILIZANDO ESTADÍSTICA BAYESIANA

Holsinger et al. (2002) han desarrollado un método de análisis de la diversidad génica, basado en el análisis probabilístico Bayesiano, aplicable a los datos derivados de marcadores dominantes. Esta metodología permite hacer una estima del nivel de diferenciación poblacional, expresado como θ_B y equivalente a los estadísticos clásicos de la F descritos por Malécot (1948) y Wright (1951) (Roeder et al. 1998; Holsinger 1999). Para ello, los datos son introducidos en formato de matriz de haplotipos binarios (0/1). La principal ventaja que aporta este método, es que permite incorporar el efecto de nuestra incertidumbre sobre la magnitud de la consanguinidad intrapoblacional (f) en nuestras estimas de la F_{ST} , aunque no se obtiene una estima precisa de estos niveles de consanguinidad. Para estos cálculos se asume que la frecuencia en la distribución alélica de cada población es dada por una distribución Beta con parámetros α y β (Crow & Kimura 1970; Ewens 1979). La obtención de las aproximaciones numéricas de θ_B (diferenciación poblacional) y f (consanguinidad intrapoblacional) se realizó a partir de simulaciones de cadenas de Markov utilizando el método de Monte Carlo (*Markov chain Monte Carlo*: MCMC) usando el algoritmo de Metropolis-Hastings (Gilks et al. 1996). Se van eligiendo los parámetros α y β de la distribución Beta que maximizan los valores de probabilidad a posteriori de θ_B y f en función de los datos de la matriz. Los métodos de MCMC dependen de la convergencia de la cadena de Markov en su distribución estacionaria. Una vez se han estabilizado los valores de probabilidad a posteriori de la cadena de Markov, se descartan las muestras iniciales previas a la estabilización de la probabilidad (*burn-in*). A partir de este punto, se hacen muestreos de los valores de θ_B y f a intervalos fijos (*thin*). De esta forma se obtiene un valor medio de θ_B y f de todos los muestreos así como su desviación estándar (stdev) y su intervalo de confianza del 95%.

Las estimas de θ_B (diferenciación poblacional) y f (consanguinidad intrapoblacional) con métodos Bayesianos se realizaron utilizando el programa Hickory v1.3 (Holsinger & Lewis 2003). En concreto se realizaron 20.000 repeticiones de la cadena de Markov, eliminando las cadenas previas a la obtención del estado estacionario (*burn-in* = 10.000). Con las 10.000 cadenas restantes se hizo un *thin* = 10, obteniéndose así un muestreo de 1.000 cadenas, número suficiente para obtener unos valores fiables de θ_B y f (Holsinger & Lewis 2003). Los parámetros α y β de la distribución Beta para el cálculo de θ_B y f se pueden definir de forma a priori, aunque se recomienda mantener los valores por defecto a no ser que se tengan conocimientos previos de θ_B y f (Holsinger & Lewis 2003; Holsinger & Wallace 2004). El programa proporciona para cada análisis, los valores de θ_B y f , así como su desviación estándar y su intervalo de confianza del 95%. También proporciona los valores de diversidad genética de cada población (h_s) definidos como la media de la heterocigosidad en caso de panmixia, H_s como la media de h_s de todas las poblaciones de la especie y H_t que es diversidad génica total de la especie basada en los promedios de las frecuencias alélicas entre las poblaciones. De todos estos valores también obtenemos su desviación estándar y su intervalo de confianza del 95%.

Los datos son analizados bajo cuatro modelos de análisis diferentes: (i) el modelo completo (*full model*), donde se calculan los valores de θ_B y f a partir de su probabilidad a posteriori; (ii) el modelo " $f=0$ " (consanguinidad = 0), donde se calcula la θ_B partiendo que no hay consanguinidad intrapoblacional; (iii) el modelo " $\theta_B=0$ " (diferenciación poblacional = 0), donde se calcula el valor de f partiendo que no hay diferenciación poblacional; (iv) el modelo " f libre" (*free model*), donde se calcula la θ_B a posteriori eligiendo valores aleatorios de f a priori. La elección de los datos de uno u otro modelo como resultado final depende del valor DIC, *Deviance Information Criterion* (criterio de desviación de la información), introducido por Spiegelhalter et al. (2002) como criterio para la elección de un modelo en contextos Bayesianos. El modelo que debemos elegir es aquel que minimiza los valores de la suma de la medida del ajuste del modelo (D_{bar}) con la medida de la complejidad del modelo (pD) ($DIC=D_{bar} + pD$). DIC solo es apropiado para comparar modelos calculados a partir del mismo conjunto de datos.

2.2.4.4 DIVERGENCIA INTERESPECÍFICA

Dado que con los datos de RAPD, y utilizando índices de similaridad, se puede calcular el grado de divergencia entre especies, se procedió a hacer una estimación de la distancia genética entre estas que pudiera servir como medida de similaridad genética. Pero como ya se ha comentado anteriormente, la interpretación de resultados obtenidos a partir del análisis de distancias genéticas entre especies utilizando marcadores dominantes, debe ser tomado con cautela (Kosman & Leonard 2005), ya que las bandas compartidas por individuos de una misma especie o por especies muy próximas filogenéticamente, es probable que sean idénticas y correspondan al mismo locus, pero las bandas compartidas por individuos de especies distantes filogenéticamente, probablemente corresponderán a loci diferentes, obteniendo así una falsa similaridad. Por ello, elegir un índice apropiado para calcular estas distancias genéticas es muy importante, ya que puede hacer cambiar mucho la topología del fenograma. En nuestro caso, se ha utilizado el coeficiente de similaridad de Dice, que frecuentemente es referido como la medida de la similaridad genética de Nei & Li (1979). Este índice da mucha importancia a las bandas compartidas entre individuos e ignora las ausencias compartidas. Dentro de las limitaciones anteriormente citadas, se considera la mejor medida de la similaridad genética para marcadores RAPD's (Belaj et al. 2003). Se calcularon las distancias entre todos los pares de haplotipos y las distancias medias entre especies con el paquete de análisis filogenético PAUP* (Swofford 2003). A partir de esta matriz de distancias y utilizando el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) y la metodología del análisis bootstrap para comprobar la robustez de las ramas (Felsenstein 1985), se construyó un fenograma con todos los individuos analizados. El análisis de bootstrap consiste en un remuestreo aleatorio y con reemplazamiento de los datos de la matriz original. De esta manera, a partir de la matriz inicial de n haplotipos con una longitud de m caracteres, se cogen aleatoriamente y con reemplazamiento, columnas de un carácter para los n haplotipos hasta formar una nueva matriz $n \times m$ de igual longitud que la inicial. A partir de esta nueva matriz se calculan las distancias entre los haplotipos, en nuestro caso la distancia de Nei & Li (1979), y utilizando el algoritmo de NJ se construye un fenograma. En nuestro caso

realizamos 500 análisis bootstrap, obteniendo al final un fenograma consenso a partir de los 500 fenogramas obtenidos (uno de cada análisis bootstrap).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Diversidad genética interpoblacional

De las cuatro especies de Sudáfrica oriental analizadas, la que presentó el mayor número de loci fue *Androcymbium austrocapense* con 1022 (Tabla 2.3). Esta especie tiene la particularidad de contar con poblaciones en ambas zonas costeras del cono sur de África, desde Ciudad del Cabo (zona más occidental) hasta Port Elizabeth (zona más oriental), pero filogenéticamente *A. austrocapense* se encuentra más próxima a las especies de Sudáfrica oriental que a las de Sudáfrica occidental (ver capítulo 3). De las especies analizadas de Namibia, *A. melanthioides* fue la que presentó mayor número de loci con 668, siendo el 96% polimórficos. En *A. asteroides* se encontraron 421 loci, resultando ser el 82% polimórficos. En *A. roseum* se encontraron 437 loci, siendo el 77% polimórficos (Tabla 2.3). Para las especies del norte de África, la que presentó un mayor número de loci fue *A. wyssianum* con 1914, resultando ser todos ellos polimórficos (100%). En el otro extremo encontramos a *A. rechingeri*, con 581 loci. Todas las especies de esta región presentan un porcentaje de loci polimórficos superior al 98%, llegando al 100% en *A. wyssianum*, *A. gramineum* y *A. hierrense* (Tabla 2.3). De la única especie analizada de Sudáfrica occidental, *A. albanense* subsp. *clanwilliamense*, se encontraron 583 loci, de los cuales el 92% resultaron ser polimórficos, valores similares, aunque un poco inferiores, a los encontrados en *A. albanense* subsp. *albanense*. Todas las especies estudiadas presentan un porcentaje de loci polimórficos superior al 92%, con la excepción de *A. asteroides* y de *A. roseum*, que presentan valores cercanos al 80% (Tabla 2.3). El porcentaje medio de loci polimórficos es ligeramente inferior en las especies de Sudáfrica oriental (98,15%) respecto a las especies de la región norteafricana (99,61%).

Los índices de diversidad genética (π_n y H_o), muestran valores medios más elevados en las especies de Sudáfrica oriental ($\pi_n = 0,34$ y $H_o = 0,38$) que en las del norte de África ($\pi_n = 0,26$ y $H_o = 0,27$) (Tabla 2.3). Las especies de Namibia *A. asteroides* y *A. roseum* presentan valores medios de diversidad genética similares al de las especies del norte de África ($\pi_n = 0,25$; $H_o = 0,32$ y $\pi_n = 0,26$; $H_o = 0,33$ respectivamente).

La especie *A. melanthioides* presenta valores de diversidad genética parecidos a los de las especies sudafricanas ($\pi_n = 0,30$; $H_o = 0,35$) (Tabla 2.3).

Tabla 2.3: Diversidad genética y diferenciación poblacional

Especie	Nº loci	Nº loci polimorficos	% loci polimorficos	Diversidad nucleotídica	Shannon	Fst
Especies de Namibia						
<i>A. asteroides</i>	421	345	81,95	0,2528 +/- 0,1266	0,3168	0,2060
<i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	668	644	96,41	0,2978 +/- 0,1487	0,3540	0,2551
<i>A. roseum</i>	437	336	76,89	0,2620 +/- 0,1393	0,3303	
Media	509	442	85,08	0,2709	0,3337	0,2305
Especies de Sudáfrica oriental						
<i>A. albanense</i> subsp. <i>albanense</i>	580	568	97,93	0,3691 +/- 0,1957	0,4288	
<i>A. austrocapense</i>	1022	1013	99,12	0,2565 +/- 0,1245	0,2965	0,4394
occidental	740	698	94,32	0,1938 +/- 0,0968	0,2365	0,1500
oriental	679	648	95,43	0,2049 +/- 0,1026	0,2330	0,4589
<i>A. leisteri</i>	785	774	98,60	0,3109 +/- 0,1561	0,3550	0,4256
<i>A. longipes</i>	557	540	96,95	0,4060 +/- 0,2152	0,4347	
Media	736	724	98,15	0,3356	0,3788	0,4325
Especies del norte de África						
<i>A. gramineum</i>	1307	1307	100,00	0,2564 +/- 0,1256	0,2845	0,3190
<i>A. hierrense</i>	1171	1171	100,00	0,1847 +/- 0,0910	0,2040	0,1215
<i>A. palaestinum</i>	814	800	98,28	0,3152 +/- 0,1651	0,3348	0,0994
<i>A. psammophilum</i>	673	671	99,70	0,2592 +/- 0,1313	0,2913	0,1300
<i>A. rechingeri</i>	581	579	99,66	0,3508 +/- 0,1886	0,3492	
<i>A. wyssianum</i>	1914	1914	100,00	0,1637 +/- 0,0786	0,1825	0,3162
Media	1077	1074	99,61	0,2550	0,2744	0,1972
Especies de Sudáfrica occidental						
<i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i>	583	536	91,94	0,3256 +/- 0,1751	0,3925	
<i>A. asteroides</i> vs. <i>A. roseum</i>						0,6000
<i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i> vs.						0,5460
<i>A. albanense</i> subsp. <i>albanense</i>						

Aunque para todas las especies estudiadas, el modelo de análisis estadístico Bayesiano que presenta valores mas bajos de DIC es el modelo $f = 0$ (consanguinidad = 0), hay que tener muy en cuenta la diferencia entre los valores DIC_{full} y $DIC_{f=0}$. No obstante los valores medios de diversidad genética obtenidos con el modelo $f = 0$ son también mas elevados en las especies de Sudáfrica oriental ($H_t = 0,27$) que en las del norte de África ($H_t = 0,19$) (Tabla 2.4). Resulta curioso observar que para las especies con elevada diferencia entre los valores de DIC_{full} y $DIC_{f=0}$, los valores de π_n y H_o son muy similares (especies del norte de África). De forma contraria, aquellas especies con poca diferencia entre los valores de DIC_{full} y $DIC_{f=0}$, los valores de π_n y H_o son diferentes.

2.3.2 Diferenciación poblacional

Dado que algunas de las especies son endemismos de distribución geográfica muy reducida, formadas en muchos casos por una única población, solo se pudieron calcular los índices de diferenciación poblacional en nueve de las 13 especies analizadas (Tabla 2.3 y 2.5).

Los valores de diferenciación medios mas elevados se encontraron en las especies de Sudáfrica oriental ($F_{ST}= 0,43$; $\theta_B= 0,39$). De esta región solo se pudo calcular el grado de diferenciación poblacional en dos especies (*A. austrocapense* y *A. leistneri*) dado que eran las únicas especies que contaban con mas de una población. Utilizando AMOVA se obtuvo un valor de diferenciación poblacional de $F_{ST}= 0,43$ para *A. leistneri*, indicando que el 43% de la diversidad genética total se atribuye a diferencias poblacionales y el 57% restante a la variabilidad intrapoblacional. Para *A. austrocapense* se obtuvo un valor de $F_{ST}= 0,44$. Esto indica que el 44% de la diversidad genética total se debe a diferencias interpoblacionales, mientras que el 56% restante de la variabilidad se debe a la componente intrapoblacional. Debido a que se muestrearon individuos de *A. austrocapense* de dos poblaciones cercanas a Ciudad del Cabo (zona occidental de Sudáfrica) y otras dos cercanas a Port Elizabeth (zona oriental de Sudáfrica), se estudió la distribución de la variabilidad en cada una de las zonas por separado. Entre las dos poblaciones de Port Elizabeth se obtuvieron valores de $F_{ST}= 0,46$, mientras que entre las dos poblaciones de Ciudad del Cabo se obtuvieron valores de $F_{ST}= 0,15$. Esto nos indica que la diferenciación poblacional entre las poblaciones de Port Elizabeth es del 46%, mientras que entre las de Ciudad del Cabo es del 15%.

Tabla 2.4: estadísticos de la diversidad genética con inferencia Bayesiana. Hs: media de la diversidad genética poblacional; Ht: diversidad genética específica

ESPECIE	MODELO	Hs	Ht
Especies de Namibia			
<i>A. asteroides</i>	full	0,2741	0,3079
	$f=0$	0,2356	0,2576
	free	0,2534	0,2825
<i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	full	0,2653	0,3078
	$f=0$	0,2182	0,2441
	free	0,2363	0,2704
<i>A. roseum</i>	full		0,3365
	$f=0$		0,2998
	free		0,3173
Media (modelo $f=0$)		0,2512	0,2672
Especies de Sudáfrica oriental			
<i>A. albanense</i> subsp. <i>albanense</i>	full		0,3731
	$f=0$		0,3154
	free		0,3472
<i>A. austrocapense</i>	full	0,1651	0,2620
	$f=0$	0,1381	0,1999
	free	0,1485	0,2288
<i>A. leistneri</i>	full	0,2302	0,3088
	$f=0$	0,1918	0,2417
	free	0,2083	0,2746
<i>A. longipes</i>	full		0,3822
	$f=0$		0,3091
	free		0,3490
Media (modelo $f=0$)		0,2386	0,2665
Especies del norte de África			
<i>A. gramineum</i>	full	0,1982	0,2617
	$f=0$	0,1494	0,1854
	free	0,1728	0,2241
<i>A. hierrense</i>	full	0,1879	0,2082
	$f=0$	0,1190	0,1294
	free	0,1492	0,1645
<i>A. palaestinum</i>	full	0,3177	0,3259
	$f=0$	0,2339	0,2433
	free	0,2700	0,2811
<i>A. psammophilum</i>	full	0,2563	0,2751
	$f=0$	0,1836	0,1963
	free	0,2152	0,2320
<i>A. rechingeri</i>	full		0,3419
	$f=0$		0,2503
	free		0,2942
<i>A. wyssianum</i>	full	0,1247	0,1748
	$f=0$	0,0879	0,1120
	free	0,1034	0,1392
Media (modelo $f=0$)		0,1707	0,1861
Especies de Sudáfrica occidental			
<i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i>	full		0,3401
	$f=0$		0,2992
	free		0,3203

También se analizó el grado de diferenciación genética entre las dos subespecies de *A. albanense* (una de Sudáfrica oriental y la otra de Sudáfrica occidental), obteniéndose un valor de $F_{ST}= 0,55$. El mejor modelo para analizar la distribución de la variabilidad genética entre las poblaciones de Sudáfrica oriental con estadísticos Bayesianos fue el $f=0$ (consanguinidad = 0), ya que presenta un menor valor de DIC, aunque la diferencia entre DIC_{full} y $DIC_{f=0}$ es solo de 34 unidades para *A. leistneri* y 49 para *A. austrocapense* (Tabla 2.5). Para *A. leistneri* el valor de diferenciación poblacional fue de $\theta_B= 0,36$ y para *A. austrocapense* fue de $\theta_B= 0,42$. Entre las poblaciones de Ciudad del Cabo de *A. austrocapense* se obtuvo un valor de $\theta_B= 0,12$, mientras que entre las Port Elizabeth el valor obtenido fue de $\theta_B= 0,41$. Para las dos subespecies de *A. albanense* se obtuvo un valor de $\theta_B= 0,44$.

De la región de Namibia se pudieron calcular los valores de diferenciación poblacional en dos especies (*A. asteroides* y *A. melanthioides*) ya que de *A. roseum* solo contamos con una población. El valor de diferenciación poblacional encontrado para *A. asteroides* fue de $F_{ST}= 0,21$, mientras que para *A. melanthioides* fue de $F_{ST}= 0,26$. Estos valores indican que existe una fuerte componente intrapoblacional para explicar la distribución de la variabilidad genética en las especies analizadas de Namibia. También se calculó el grado de diferenciación genética entre *A. asteroides* y *A. roseum*, ya que en un reciente trabajo se habían descrito como dos subespecies de *A. roseum* (Müller-Doblies & Müller-Doblies 2002) y se quiso comprobar el grado de diferenciación entre estas especies o posibles subespecies. Este valor fue de $F_{ST}= 0,60$, indicando un alto grado de diferenciación genética, ya que solo el 40% de la variación total se encuentra dentro estas dos especies (Tabla 2.3). Utilizando estadística Bayesiana para caracterizar la distribución de la variabilidad genética entre las poblaciones se obtuvo que, tanto para *A. asteroides* como para *A. melanthioides*, el modelo que presentaba un menor valor de DIC, y por tanto el que mejor se ajusta a los datos, era el $f= 0$ (consanguinidad = 0). A pesar de ello, la diferencia entre DIC_{full} y $DIC_{f=0}$ es solo de 16 unidades para *A. asteroides* y 31 para *A. melanthioides* (Tabla 2.5).

Tabla 2.5: Diferenciación genética entre poblaciones y consanguinidad intrapoblacional, con su desviación estándar y su intervalo de confianza del 95%.

ESPECIE	MODELO	DIC	θ_B	dev. st.	I.C. 95%	f	dev. st.	DICfull-DIC $f=0$
Especies de Namibia								
<i>A. asteroides</i>	full	2302,77	0,1926	0,0187	0,1572	0,2280	0,9877	0,0117
	$f=0$	2286,67	0,1786	0,0178	0,1473	0,2154		
	$\theta_B=0$	3040,56					0,9863	0,0127
	free	2315,86	0,1960	0,0175	0,1644	0,2296	0,5256	0,2950
<i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	full	4218,63	0,2309	0,0121	0,2078	0,2545	0,9941	0,0059
	$f=0$	4187,45	0,2199	0,0160	0,1895	0,2536		
	$\theta_B=0$	5940,62					0,9938	0,0061
	free	4229,46	0,2353	0,0151	0,2036	0,2635	0,4475	0,2880
			0,1993					
Especies de Sudáfrica oriental								
<i>A. austrocapense</i>	full	8842,13	0,4547	0,0089	0,4374	0,4700	0,9969	0,0030
	$f=0$	8793,39	0,4195	0,0105	0,3995	0,4412		
	$\theta_B=0$	20274,93					0,9976	0,0024
	free	8875,69	0,4488	0,0100	0,4292	0,4624	0,4929	0,2849
<i>A. austrocapense</i> occidental	full	4670,55	0,1321	0,0117	0,1084	0,1558	0,9960	0,0042
	$f=0$	4641,11	0,1212	0,0106	0,1023	0,1431		
	$\theta_B=0$	5642,08					0,9946	0,0054
	free	4679,14	0,1413	0,0137	0,1176	0,1701	0,4728	0,2944
<i>A. austrocapense</i> oriental	full	3643,57	0,4122	0,0149	0,3839	0,4413	0,9929	0,0071
	$f=0$	3604,04	0,4142	0,0154	0,3825	0,4430		
	$\theta_B=0$	7193,11					0,9942	0,0059
	free	3656,11	0,4195	0,0149	0,3911	0,4509	0,5464	0,2798
<i>A. leistneri</i>	full	4445,69	0,3680	0,0124	0,3428	0,3922	0,9946	0,0054
	$f=0$	4411,56	0,3640	0,0130	0,3395	0,3919		
	$\theta_B=0$	7935,30					0,9952	0,0049
	free	4465,42	0,3767	0,0138	0,3496	0,4024	0,5058	0,2953
Media θ_B (modelo $f=0$)			0,3918					
Especies del norte de África								
<i>A. gramineum</i>	full	9887,30	0,3469	0,0090	0,3314	0,3626	0,9981	0,0018
	$f=0$	9757,53	0,3355	0,0102	0,3133	0,3550		
	$\theta_B=0$	17538,72					0,9982	0,0017
	free	9884,26	0,3539	0,0098	0,3362	0,3741	0,5455	0,2814
<i>A. hierrense</i>	full	8425,15	0,1624	0,0088	0,1453	0,1809	0,9986	0,0013
	$f=0$	8193,31	0,1840	0,0109	0,1635	0,2049		
	$\theta_B=0$	10729,43					0,9980	0,0021
	free	8310,17	0,1759	0,0122	0,1533	0,2018	0,5119	0,2819
<i>A. palaestinum</i>	full	4562,38	0,0477	0,0140	0,0238	0,0706	0,9972	0,0028
	$f=0$	4463,54	0,0781	0,0102	0,0582	0,0983		
	$\theta_B=0$	5071,79					0,9935	0,0065
	free	4528,07	0,0760	0,0145	0,0522	0,1119	0,4885	0,2804
<i>A. psammophilum</i>	full	3981,94	0,1328	0,0147	0,1060	0,1628	0,9966	0,0033
	$f=0$	3888,34	0,1688	0,0173	0,1357	0,2039		
	$\theta_B=0$	4831,89					0,9948	0,0052
	free	3942,76	0,1605	0,0173	0,1287	0,1978	0,5038	0,2906
<i>A. wysianum</i>	full	24016,85	0,3424	0,0052	0,3327	0,3552	0,9991	0,0008
	$f=0$	23733,04	0,2798	0,0068	0,2674	0,2919		
	$\theta_B=0$	45591,98					0,9992	0,0008
	free	23870,57	0,3193	0,0077	0,3028	0,3345	0,4825	0,2969
Media θ_B (modelo $f=0$)			0,2092					
<i>A. asteroides</i> vs. <i>A. roseum</i>	full	3407,17	0,5330	0,0129	0,5075	0,5581	0,9896	0,0103
	$f=0$	3401,16	0,5216	0,0140	0,4928	0,5481		
	$\theta_B=0$	10090,04					0,9947	0,0051
	free	3440,96	0,5363	0,0141	0,5086	0,5650	0,5040	0,2814
<i>A. albanense</i> subsp. <i>albanense</i> vs. <i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i>	full	4200,91	0,4421	0,0131	0,4424	0,4639	0,9938	0,0064
	$f=0$	4168,27	0,4370	0,0144	0,4093	0,4635		
	$\theta_B=0$	8818,95					0,9950	0,0046
	free	4214,61	0,4520	0,0137	0,4269	0,4798	0,5042	0,2801

El valor de diferenciación poblacional (θ_B) para *A. asteroides* fue de $\theta_B = 0,18$, mientras que para *A. melanthioides* fue de $\theta_B = 0,22$, valores similares, aunque un poco inferiores, a los obtenidos con AMOVA. Entre *A. asteroides* y *A. roseum* se encontró un valor de $\theta_B = 0,52$, señalando la gran diferenciación genética entre las dos especies (Tabla 2.5).

El valor medio de diferenciación genética poblacional encontrado para las especies de la región norteafricana es de $F_{ST} = 0,20$; $\theta_B = 0,21$ (utilizando el modelo $f = 0$), aproximadamente la mitad del encontrado en las especies de Sudáfrica oriental. Es interesante hacer una diferenciación para las especies norteafricanas, a la hora de analizar los valores medios de F_{ST} y θ_B , entre las especies de amplia distribución geográfica y con mayor número de poblaciones (*A. gramineum* y *A. wyssianum*), y las especies insulares (*A. psammophilum* y *A. hierrense*) y con poblaciones muy próximas (*A. palaestinum*). Para las especies con amplia distribución geográfica, el valor medio resultó ser de $F_{ST} = 0,32$; $\theta_B = 0,31$, indicando que hay un cierto grado de diferenciación poblacional dentro de estas especies, pero menor que el encontrado en las especies de Sudáfrica. Para las especies insulares y para *A. palaestinum*, se obtuvieron unos valores promedios de diferenciación poblacional de $F_{ST} = 0,12$; $\theta_B = 0,14$. Esto nos indica que, como media, entre el 86% - 88% de la variación genética en estas especies se debe a la componente intrapoblacional, habiendo muy poca diferenciación genética entre las poblaciones.

De Sudáfrica occidental no obtuvimos valores de diferenciación poblacional, ya que solo se analizó una especie con una única población conocida, y porque estas especies ya se habían estudiado exhaustivamente con anterioridad utilizando aloenzimas (Membrives 2000).

2.3.3 Diferenciación interespecífica

La distancia media entre las especies del norte de África es $D = 0,39$, mientras que para las especies de Sudáfrica oriental es $D = 0,32$ (Tabla 2.6). El valor más pequeño de distancia interespecífica se encontró entre *A. asteroides* y *A. roseum* ($D = 0,18$), mientras que el valor más elevado ocurre entre *A. psammophilum* y *A. decipiens*

(D= 0,47), *A. psammophilum* y *A. melanthioides* (D= 0,47) y *A. rechingeri* y *A. decipiens* (D= 0,47) (Tabla 2.6).

Tabla 2.6: distancias de Nei - Li entre las especies estudiadas de *Androcymbium*

Especies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. <i>A. gramineum</i>																
2. <i>A. hierrense</i>	0,388															
3. <i>A. palaestinum</i>	0,317	0,380														
4. <i>A. psammophilum</i>	0,386	0,404	0,406													
5. <i>A. rechingeri</i>	0,400	0,426	0,418	0,354												
6. <i>A. wyssianum</i>	0,369	0,401	0,351	0,415	0,425											
7. <i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i>	0,354	0,418	0,379	0,421	0,453	0,400										
8. <i>A. albanense</i> subsp. <i>albanense</i>	0,369	0,417	0,388	0,458	0,419	0,392	0,258									
9. <i>A. austrocapense</i> ori.	0,367	0,408	0,391	0,413	0,444	0,396	0,347	0,272								
10. <i>A. austrocapense</i> occ.	0,358	0,414	0,363	0,416	0,464	0,401	0,325	0,326	0,217							
11. <i>A. decipiens</i>	0,418	0,425	0,443	0,474	0,471	0,400	0,377	0,335	0,341	0,363						
12. <i>A. leisteri</i>	0,353	0,405	0,388	0,463	0,437	0,394	0,352	0,314	0,297	0,343	0,300					
13. <i>A. longipes</i>	0,394	0,422	0,401	0,464	0,454	0,406	0,382	0,316	0,322	0,368	0,315	0,338				
14. <i>A. asteroides</i>	0,381	0,432	0,389	0,422	0,424	0,394	0,356	0,341	0,367	0,354	0,346	0,336	0,347			
15. <i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	0,420	0,430	0,387	0,470	0,483	0,411	0,373	0,364	0,348	0,381	0,400	0,369	0,363	0,356		
16. <i>A. roseum</i>	0,372	0,421	0,369	0,446	0,425	0,360	0,377	0,327	0,331	0,331	0,305	0,331	0,378	0,182	0,348	

Distancia entre especies del norte de África: 0,389

Distancia entre especies de Sudáfrica oriental: 0,318

A partir de estas distancias y utilizando el algoritmo de NJ se generó un fenograma con las especies analizadas (Fig. 2.2). La especie *A. melanthioides* se utilizó como grupo externo, ya que según la filogenia de Vinnersten & Reeves (2003), es la especie de *Androcymbium* más ancestral de las analizadas. En este árbol se observan tres clusters principales. Uno agrupa a todas las especies de Sudáfrica, otro a las especies del norte de África y un tercero, y en posición basal a estos, une a *A. asteroides* con *A. roseum*. Genéticamente, las especies *A. melanthioides*, *A. asteroides* y *A. roseum* se encuentran ligeramente más próximas a las especies de Sudáfrica oriental y occidental que a las del norte de África, teniendo en cuenta el sesgo que puede provocar haber tratado con una única especie de Sudáfrica occidental (tabla 2.7).

Tabla 2.7: distancias de Nei - Li entre las especies de Namibia y la de Sudáfrica occidental y las especies del norte de África y Sudáfrica oriental.

Especies	1	2	3	4	5	6
1. Norte de Africa	0,389					
2. <i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i>	0,404					
3. Sudáfrica oriental	0,414	0,340	0,318			
4. <i>A. asteroides</i>	0,407	0,356	0,349			
5. <i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	0,434	0,373	0,371	0,356		
6. <i>A. roseum</i>	0,399	0,377	0,334	0,182	0,348	

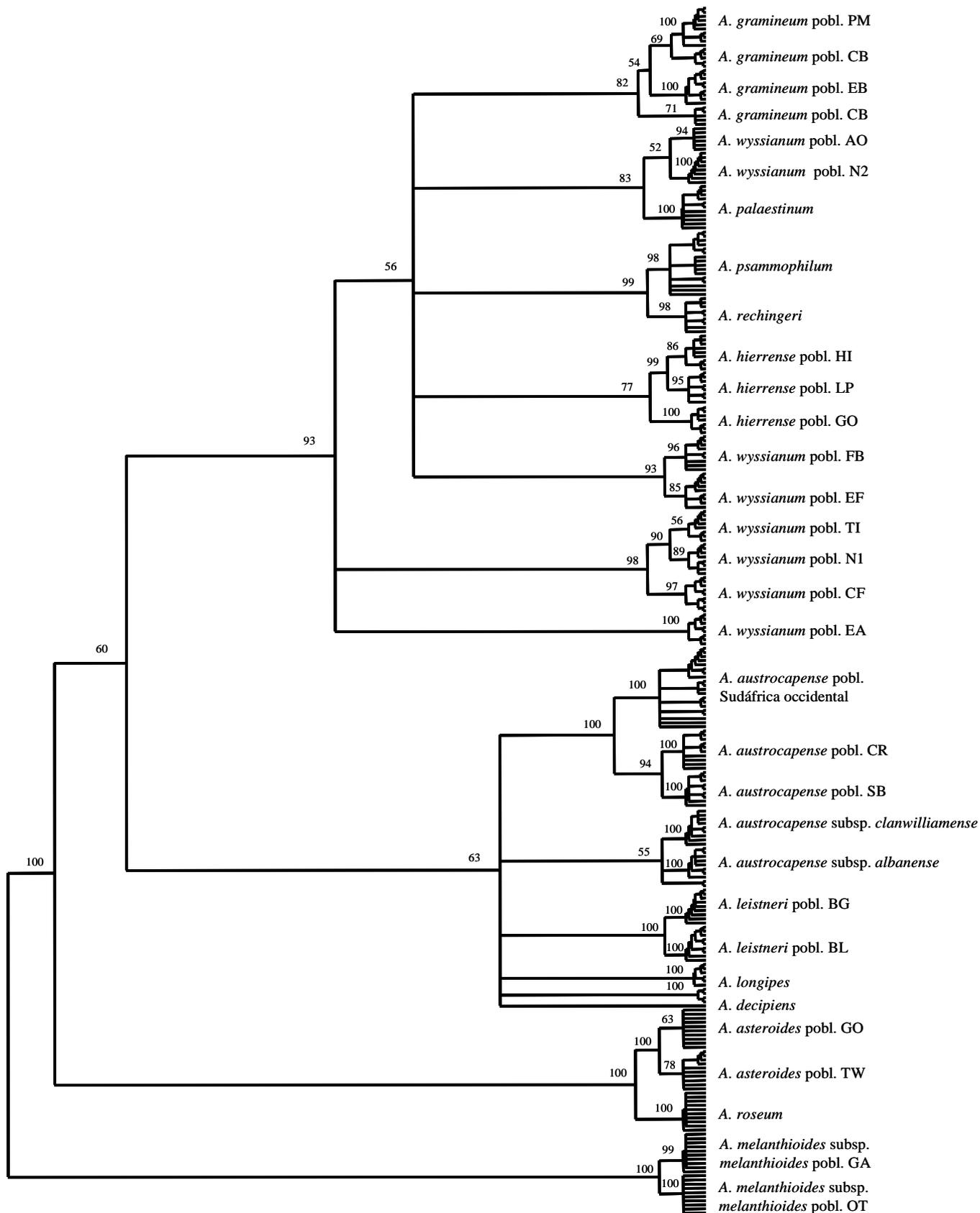


Figura 2.2: fenograma bootstrap estricto consenso realizado utilizando la distancia de Nei-Li (1979) y el algoritmo de NJ. Se realizaron 500 análisis bootstrap. Los valores encima de cada nodo indican su robustez.

2.4 DISCUSIÓN

La cantidad y la distribución de la variabilidad genética encontrada en este estudio, refleja la huella dejada por los factores biológicos y ecológicos, que determinan la amplitud del flujo génico en el espacio, y también por el contexto histórico-ambiental vivido en la poblaciones naturales durante su dinámica evolutiva. En función del grado de influencia de todos estos parámetros sobre las poblaciones naturales, encontramos unos valores de cantidad y de distribución de variabilidad genética determinados.

2.4.1 Estudios previos con aloenzimas

Hasta la fecha se habían caracterizado los parámetros de la diversidad genética mediante métodos enzimáticos en especies del género *Androcymbium* que habitan el norte de África e Islas Canarias (Pedrola-Monfort 1993; Pedrola-Monfort & Caujapé-Castells 1994, 1996) y en Sudáfrica occidental (Membrives et al. 2001). Estos estudios indicaban que las especies del norte de África presentaban mayor diversidad ($H_t = 0,280$) que las del sur ($H_t = 0,152$), aunque esto último era resultado de la menor diversidad observada en las especies autocompatibles (Membrives 2000) (Tabla 2.8). En estas, el aumento de la consanguinidad intrapoblacional en los casos de autofecundación se traduce en una disminución de la heterocigosis. Para las especies de esta región se estableció una correlación significativa entre sistema de reproducción (autocompatible – autoincompatible) y los parámetros de la diversidad génica a nivel específico (H_s) y poblacional (H_p). Las especies de Sudáfrica occidental con sistema reproductivo autoincompatible (AIC) mostraron valores de diversidad genética superiores a las especies con sistema reproductivo autocompatible (AC). Esta correlación fue del 70,4% a nivel específico y del 90,9% a nivel poblacional (Membrives et al. 2001). Esta correlación no se observó en las especies del norte de África, ya que todas poseen un sistema reproductivo autocompatible. Los valores de diferenciación genética entre poblaciones (G_{ST}) resultaron ser, en general, superiores para las especies de Sudáfrica occidental (Tabla 2.8). La explicación mas plausible para explicar esta mayor diferenciación

poblacional en Sudáfrica apoyaría al mayor tiempo evolutivo transcurrido desde su origen y a un mayor efecto de la selección natural debido al mosaicismo de hábitats existente en Sudáfrica occidental (Membrives et al. 2001).

Tabla 2.8: variabilidad genética y diferenciación poblacional obtenida a partir del análisis aloenzimático. (Datos de Membrives 2000).

Especie	Hop	Hos	Hep	Hes	Hs	Ht	Gst
Especies del norte de África*							
<i>A. gramineum</i>	0,165	0,153	0,193	0,216	0,186	0,246	24,4
<i>A. hierrense</i>	0,107	0,105	0,058	0,055	0,056	0,057	0,9
<i>A. palaestinum</i>	0,273	0,192	0,283	0,241	0,248	0,300	17,2
<i>A. psammophilum</i>	0,100	0,100	0,053	0,053	0,052	0,052	0,0
<i>A. rechingeri</i>	0,278	0,278	0,327	0,327	0,327	0,327	-
<i>A. wyssianum</i>	0,232	0,203	0,243	0,238	0,219	0,248	11,5
Media especies insulares	0,104	0,103	0,056	0,054	0,054	0,055	0,5
Media resto especies	0,237	0,207	0,262	0,256	0,245	0,280	17,7
Media Norte de Africa	0,193	0,172	0,193	0,188	0,181	0,205	10,8
Especies de Sudáfrica occidental							
Preferiblemente autoincompatibles							
<i>A. bellum</i>	0,182	0,182	0,180	0,180	0,180	0,180	-
<i>A. burchellii</i> subsp. <i>burchellii</i>	0,163	0,163	0,170	0,170	0,170	0,170	-
<i>A. burchellii</i> subsp. <i>pulchrum</i>	0,270	0,259	0,249	0,286	0,244	0,288	15,3
<i>A. circinatum</i>	0,204	0,199	0,238	0,232	0,232	0,301	23,3
<i>A. hantamense</i>	0,119	0,119	0,149	0,149	0,149	0,149	-
<i>A. villosum</i>	0,217	0,210	0,250	0,308	0,243	0,320	24,1
<i>A. walteri</i>	0,228	0,228	0,225	0,225	0,225	0,225	-
Media autoincompatibles	0,198	0,194	0,209	0,221	0,206	0,233	20,9
Autocompatibles							
<i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i>	0,119	0,132	0,111	0,111	0,111	0,111	-
<i>A. austrocapense</i>	0,132	0,154	0,085	0,089	0,083	0,092	9,8
<i>A. capense</i>	0,154	0,051	0,092	0,092	0,092	0,092	-
<i>A. cuspidatum</i>	0,043	0,005	0,048	0,060	0,047	0,058	17,2
<i>A. dregei</i>	0,005	0,071	0,059	0,059	0,059	0,059	-
<i>A. eghimocymbion</i>	0,071	0,000	0,041	0,116	0,039	0,125	68,8
<i>A. henssenianum</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-
<i>A. huntleyi</i>	0,000	0,083	0,051	0,062	0,045	0,076	40,8
<i>A. irroratum</i>	0,073	0,077	0,068	0,279	0,065	0,298	78,2
<i>A. poeltianum</i>	0,077	0,194	0,039	0,039	0,038	0,038	0
Media autocompatibles	0,067	0,077	0,059	0,091	0,058	0,095	35,8
Media Suráfrica occidental	0,121	0,125	0,121	0,145	0,119	0,152	30,8

Especies de Sudáfrica occidental ordenadas según su sistema reproductivo.

*Todas son autocompatibles

Obviamente, los valores de diversidad genética y diferenciación poblacional obtenidos con la técnica RAPD, no son comparables de forma absoluta a los

obtenidos con aloenzimas, pero si que pueden ser comparados de forma relativa. Esto es interesante porque, aunque se hayan utilizado técnicas diferentes, podemos comparar como se comporta la variabilidad genética y como se distribuye en las diferentes áreas disjuntas del género en África.

2.4.2 Diversidad genética con RAPD's

En nuestro análisis con RAPD's observamos una mayor diversidad en el número de bandas (loci) en las especies norteafricanas que en las Sudafricanas, pero estas últimas presentan valores mas altos de los índices de diversidad nucleotídica (π_n), índice de Shannon (H_o) y de diversidad total (H_t) (Tabla 2.3, 2.5). Esto es debido a que en las especies del norte de África se encuentran un gran número de bandas que se detectan en uno o unos pocos de los individuos analizados y se pueden considerar como loci raros. En Sudáfrica, aunque el número de bandas es menor, todas ellas se encuentran en frecuencias elevadas, lo que aumenta el valor de los índices de diversidad. Las especies de Namibia, especialmente *A. asteroides* y *A. roseum*, son en las que se detectan un menor número de bandas y menor grado de loci polimórficos, sin embargo, los niveles de diversidad son muy parecidos, sino ligeramente superiores, a los que se detectan en las especies de norte de África (Tabla 2.3. 2.5).

2.4.3 Diferenciación poblacional con RAPD's

Los valores medios de diferenciación poblacional (F_{ST} ; θ_B) indican que las especies estudiadas de Sudáfrica oriental presentan un importante grado de diferenciación entre sus poblaciones ($F_{ST}= 0,43$; $\theta_B= 0,39$), que duplica, en general, a los que se detectan entre las poblaciones del norte de África ($F_{ST}= 0,20$; $\theta_B= 0,21$) y Namibia ($F_{ST}= 0,23$; $\theta_B= 0,20$). Esto implica que en la distribución de la variabilidad genética de las especies de Sudáfrica oriental, la componente interpoblacional es muy importante, tal y como sucede con las especies de Sudáfrica occidental (Membrives et al. 2001). Así mismo, para entender la estructuración genética de las especies de Namibia, es muy importante la componente intrapoblacional, tal y como se observa con RAPD's en las especies del norte África y se observó previamente con

aloenzimas (Pedrola-Monfort & Caujapé-Castells 1994, 1996). Estos elevados valores de diferenciación poblacional en Sudáfrica oriental pueden ser debidos a varias causas: a la selección, a deriva genética, a la restricción del flujo génico entre poblaciones o a cuellos de botella. Para las especies del norte de África, dada la homogeneidad de los hábitats y la distribución de la variabilidad aloenzimática, se sugirió que la diferenciación poblacional se debió a procesos estocásticos donde la deriva genética podría haber jugado un papel predominante (Pedrola-Monfort & Caujapé-Castells 1994). Para las especies de Sudáfrica occidental, el mosaicismo de hábitats y la distribución de la variabilidad aloenzimática, sugirieron que esta diferenciación poblacional se podría haber debido a procesos de selección. Entre las poblaciones de Sudáfrica oriental no se ha observado el mosaicismo de hábitats que se observa entre las poblaciones de Sudáfrica occidental, descartando así la selección como factor importante a la hora de generar diferenciación poblacional. Dado que esta diferenciación poblacional entre las poblaciones de Sudáfrica oriental es superior al observado en las especies del norte de África, sugerimos que el principal factor para generarla podría haber sido la restricción de flujo génico entre las poblaciones y favorecido por el sistema reproductivo que presentan (autocompatible). Estos dos factores (autogamia y ausencia de flujo) habrían eliminado a aquellos loci raros que aun observamos en las especies del norte de África. Para las especies de Namibia, los valores de diferenciación poblacional parecen estar relacionados con procesos estocásticos, donde la deriva genética podría ser el principal factor, al igual que en el norte de África dada la similitud obtenida en los valores de diferenciación.

2.4.4 Diversidad genética y diferenciación poblacional en las especies de Sudáfrica oriental.

En esta región solo se pudo estudiar la distribución de la variabilidad genética en dos especies, *A. austrocapense* y *A. leistneri*, y de dos subespecies de *A. albanense* (subsp. *albanense*; Sudáfrica oriental y subsp. *clanwilliamense*; Sudáfrica occidental) debido a que del resto de especies solo se pudo muestrear una población.

Androcymbium austrocapense cuenta con cuatro poblaciones muestreadas, dos en Ciudad del Cabo (Sudáfrica occidental) y dos mas en Port Elizabeth (Sudáfrica

oriental), ambas en zonas costeras. Seguramente, dada las características de la evolución del género (ver capítulo 3), esta especie tenga su origen en Sudáfrica occidental, y por tanto, las poblaciones de esta región sean las mas antiguas. Esta hipótesis puede verse refutada si observamos los valores de diferenciación poblacional (F_{ST} ; θ_B) para esta especie. Para las poblaciones de Sudáfrica occidental el valor de este índice es muy bajo ($F_{ST}= 0,15$; $\theta_B= 0,12$), mientras que para las poblaciones de Sudáfrica oriental es muy elevado ($F_{ST}= 0,46$; $\theta_B= 0,41$). La elevada diferenciación poblacional entre las poblaciones de Sudáfrica oriental podría llevar a pensar a que estas poblaciones son mas antiguas. De las dos poblaciones de Sudáfrica occidental, una de ellas habita en la parte superior de un acantilado (100 metros de altura) y la otra en la misma playa, mientras que las dos poblaciones de Sudáfrica oriental habitan en la playa. Las diferentes oscilaciones habidas en el nivel del mar (sobretudo en las glaciaciones cuaternarias) habrían producido grandes mortalidades en las poblaciones costeras que no habrían afectado a la que habita en lo alto del acantilado. Estas poblaciones afectadas en Sudáfrica occidental se habrían repoblado con individuos de la parte alta del acantilado, mientras que las poblaciones de Sudáfrica oriental habrían sufrido grandes cuellos de botella acentuándose así la diferenciación genética entre ellas. Ello explicaría la gran diferenciación poblacional observada entre las poblaciones de la zona oriental. Por tanto, el grado de diferenciación poblacional no es un valor indicativo de la antigüedad de las poblaciones de una u otra área.

De *Androcymbium leistneri* se estudiaron dos poblaciones. Estas poblaciones se encuentran situadas dentro del Jardín Botánico de Bloemfontein, muy cercanas la una de la otra. Una población se encuentra en la base una montaña y la otra en una posición mas elevada. Resulta muy curioso observar la gran diferenciación poblacional encontrada en esta especie ($F_{ST}= 0,43$; $\theta_B= 0,36$), dado que las dos poblaciones se encuentran muy próximas. El hecho de tener un sistema reproductivo preferentemente autocompatible, que sus cápsulas no posean ningún elemento mecánico para facilitar su diseminación y que sean dehiscentes, facilitando así que las semillas caigan cercanas al individuo, habrían dificultado el flujo génico de estas

dos poblaciones. Por ello se observan estos elevados valores de diferenciación poblacional.

Las dos subespecies estudiadas de *A. albanense* se encuentran muy separadas geográficamente, aproximadamente 800 km. Las dos subespecies presentan valores similares de diversidad genética, aunque siempre son superiores los de la subespecie *albanense*. Entre las dos subespecies se encontró un elevado valor de diferenciación poblacional ($F_{ST}= 0,55$; $\theta_B= 0,44$) causado seguramente por la gran separación geográfica que imposibilita el flujo génico entre ellas y haya promovido que se fijen características génica diferentes. Debido a ciertas características morfológicas encontradas recientemente y a su posición en el árbol filogenético (ver capítulo 3), se puede llegar a pensar que son especies diferentes. Los datos aquí encontrados de diferenciación poblacional apoyarían esta hipótesis. Membrives et al. (2001) encontraron en su estudio con aloenzimas de las especies de Sudáfrica occidental, que existía una correlación significativa entre niveles de variabilidad genética y sistema reproductivo. Si extrapolamos estos datos de aloenzimas a los datos obtenidos con RAPD's, podríamos intuir que los valores de diversidad genética de las especies de Sudáfrica occidental que presentan un sistema reproductivo autocompatible, deberían ser similares a aquellos encontrados en las especies de Sudáfrica oriental con RAPD's, ya que todas las especies de esta zona presentan un sistema reproductivo preferentemente autocompatible. Hasta que no se analicen los RAPD's de las especies de Sudáfrica occidental no se podrá comprobar si esta afirmación es cierta.

2.4.5 Diversidad genética y diferenciación poblacional en las especies de Namibia.

Las especies de Namibia, especialmente *A. asteroides* y *A. roseum*, son en las que se detecta un menor número de bandas y menor grado de loci polimórficos, sin embargo, los niveles de diversidad son muy parecidos, sino ligeramente superiores, a los que se detectan en las especies del norte de África (Tabla 2.3; 2.4). Por tanto, la dinámica evolutiva de sus poblaciones será similar a la descrita anteriormente para las especies del norte de África.

Androcymbium asteroides es una especie que se encuentra distribuida por el norte de la provincia del Cabo (Sudáfrica) y por el sureste de Namibia (Manning & Goldblatt 2001). *Androcymbium roseum* se encuentra distribuida por el cinturón estepárico tropical (lluvias de verano e invierno) de Namibia y de la Flora Zambésica (Zambia, Botswana y Zimbawe), radiando hacia Angola por el noroeste (Müller-Doblies & Müller-Doblies 2002). Estas dos especies habitan en márgenes de ríos que suelen presentar crecidas periódicas en primavera e invierno. Las dos se encuentran muy próximas filogenéticamente, e incluso hay autores que las consideran dos subespecies de *A. roseum*: *A. roseum* subsp. *albiflorum* y *A. roseum* subsp. *roseum* (Müller-Doblies & Müller-Doblies 2002). Estas están muy relacionadas filogenéticamente con las del norte del continente (ver capítulo 3). Tanto el número como el porcentaje de loci polimórficos y los valores de diversidad genética, son muy similares entre ambas especies, indicando una historia evolutiva similar. De *A. asteroides* se han estudiado dos poblaciones que habitan en los márgenes del ríos Auob y Olifants, separadas unos 20 km la una de la otra, obteniéndose un valor de $F_{ST} = 0,20$ y $\theta_B = 0,18$ e indicándonos así la existencia de un cierto flujo génico entre estas poblaciones. Dadas sus características ecológicas, semillas o cápsulas enteras de un individuo pueden llegar de una a otra población gracias al arrastre de los ríos, haciendo así que se mantenga un cierto flujo génico entre poblaciones.

De la especie *A. roseum* hemos estudiado una población situada en las fuentes termales de Barmen (Namibia, a unos 400 km al noroeste de las dos poblaciones de *A. asteroides*). También habita en los márgenes de un río, el Swakop, e incluso en las emergencias de estas fuentes termales. Al comparar el grado de diferenciación entre las dos especies, dada la asignación como subespecies propuesta por Müller-Doblies & Müller-Doblies (2002), se observó un valor muy alto ($F_{ST} = 0,60$; $\theta_B = 0,52$), indicativo del alto grado de separación génica entre las dos especies. Seguramente la separación de estos dos taxa ha sido reciente, y esta puede haber sido debida al aislamiento geográfico entre ellos, haciendo muy difícil que pueda haber flujo génico entre los dos taxa y propiciando así la especiación.

De la especie *A. melanthioides* se han descrito hasta la fecha tres subespecies: *A. melanthioides* ssp. *melanthioides*, *A. melanthioides* ssp. *australe* y *A. melanthioides* ssp.

transvaalense (Müller-Doblies & Müller-Doblies 1998). Esta especie se encuentra distribuida en zonas de altiplanicies por el sur y el oeste de Namibia y en Sudáfrica por la provincia del Cabo, en el Transvaal y en Orange Free State. En nuestro estudio hemos trabajado con dos poblaciones de la subespecie *melanthioides*, la única que se encuentra distribuida en Namibia. Los valores de diferenciación poblacional ($F_{ST}=0,26$; $\theta_B=0,22$) nos indican un cierto grado de diferenciación genética entre las dos poblaciones, aunque la componente intrapoblacional es la más importante a la hora de explicar la distribución de la variabilidad genética. Estas dos poblaciones se encuentran separadas unos 300 km., y este valor de diferenciación poblacional seguramente es debido a esta separación geográfica que ha provocado un aislamiento genético de las poblaciones haciendo que se fijan diferentes loci en cada población por efecto de la deriva genética.

2.4.6 Diversidad genética y evolución

Se puede observar pues, que los niveles de variabilidad genética y su distribución no están relacionadas con la evolución de estas especies. En el árbol filogenético (ver capítulo 3), se puede comprobar que las especies del norte de África y de Sudáfrica oriental aparecen juntas en un mismo clado, siendo más próximas evolutivamente las unas con las otras que no con las especies de Sudáfrica occidental. Sin embargo, si miramos el comportamiento de los valores de variabilidad genética, este es similar en todas las especies de Sudáfrica y diferente al de las del norte de África, como sucede con las especies de Namibia. Aunque el comportamiento de la variabilidad genética en estas tres especies de Namibia es similar, *A. melanthioides* aparece muy alejada evolutivamente de las otras dos. Todo parece apuntar que la variabilidad genética está más relacionada con factores biológicos e histórico-ambientales que con las dinámicas evolutivas de este género, tal y como indica Olmstead (1990) y como encontraron para *Androcymbium* en anteriores estudios con las especies de Sudáfrica occidental Membrives et al. (2001).

2.4.7 Consanguinidad intrapoblacional

Utilizando métodos estadísticos Bayesianos para calcular la diversidad genética y la diferenciación poblacional a partir de marcadores dominantes, se puede hacer una aproximación de los niveles de consanguinidad intrapoblacional. Los valores obtenidos a nivel cuantitativo no son muy fiables, pero si de forma cualitativa (Holsinger & Wallace 2004), es decir, no se puede cuantificar el valor real de la consanguinidad intrapoblacional de forma exacta, pero si podemos valorar si tiene efecto sobre la dinámica evolutiva de las poblaciones. Para todas las especies analizadas, hemos visto que el modelo que mejor explica las características genéticas de las poblaciones, es aquel que parte de la hipótesis de la no existencia de consanguinidad intrapoblacional (modelo $f=0$), dado que presentan un menor valor de DIC. Para las especies del norte de África e Islas Canarias esta afirmación es del todo cierta, ya que hay mucha diferencia entre los valores de DIC_{full} y $DIC_{f=0}$ (Tabla 2.5). En el resto de especies analizadas encontramos poca diferencia entre estos dos valores, por tanto, el hecho de introducir nuestra incertidumbre sobre el valor de la consanguinidad en el análisis, no afecta a resultado final de este. Por tanto, para las especies del norte de África y Canarias, parece ser que la consanguinidad intrapoblacional es cercana a cero, mientras que para las especies de Sudáfrica oriental y Namibia, el hecho que esta sea cero o prácticamente uno no afecta al resultado final.

Dado que no es muy fiable hacer con este método Bayesiano aproximaciones de los niveles de consanguinidad poblacional utilizando marcadores dominantes, es mejor no hacer mas interpretaciones de los resultados y esperar a un futuro análisis con este método de los datos aloenzimáticos (marcadores codominantes) para poder hacer una aproximación mas certera de los niveles de consanguinidad intrapoblacional.

2.4.8 Diferenciación interespecífica

Todas las conclusiones que se puedan extraer a partir del análisis de distancias genéticas obtenidas con marcadores dominantes deben ser tratadas con mucha cautela (Kosman & Leonard 2005). A pesar de ello, en el fenograma (Fig. 2.2)

podemos observar que todas las especies del norte de África se agrupan formando un cluster, así como todas las especies de Sudáfrica, tal y como sucede en la filogenia obtenida en este trabajo (Cap. 3)

Tanto *A. melanthioides*, *A. asteroides*, como *A. roseum*, se encuentran mas cercanas genéticamente con las distancias de RAPD, a las especies de Sudáfrica oriental que a las del norte de África (Tabla 2.7). Ciertamente, estas tres especies habitan en el sur de África, mas próximas geográficamente de las especies de Sudáfrica oriental que de las del norte de África, pero es curioso observar que en la filogenia obtenida en este estudio *A. roseum* aparece formando un clado con las especies del norte de África y *A. asteroides* se encuentra en posición basal a estas. De hecho, existe un gran parecido morfológico entre *A. roseum* y las especies del norte del continente, y en el trabajo de cruzabilidad realizado recientemente, se han obtenido individuos viables fruto de cruzar de *A. roseum* con algunas especies del norte de África (Cap. 3).

Debido a las limitaciones que presenta la interpretación de los fenogramas realizados a partir de las distancias genéticas obtenidas con marcadores dominantes, es mejor no tratar de especular con estos datos y esperar a próximas aproximaciones con otras metodologías.

2.5 CONCLUSIONES

- Los valores obtenidos con RAPD no son directamente comparables con los obtenidos en anteriores estudios con aloenzimas. Sin embargo, si que se pueden comparar de forma relativa, dado que las especies que han tenido valores mas altos de variabilidad genética y diferenciación poblacional con aloenzimas también los han obtenido con RAPD.
- Los valores de variabilidad genética a nivel poblacional son muy similares entre las especies del norte de África e Islas Canarias y las especies de Sudáfrica oriental. Esto era de esperar dado que se ha demostrado que los valores de variabilidad poblacional están correlacionados con el sistema reproductivo, y todas estas especies presentan un sistema autocompatible.
- Los valores de variabilidad genética a nivel específico son mas elevados en las especies de Sudáfrica oriental que en las especies del norte de África e Islas Canarias. Aunque a nivel poblacional no se observa esta diferencia, ello se debe que la diferenciación poblacional es superior en Sudáfrica oriental. Todas las poblaciones tienen un valor de variabilidad genética similar, pero al haber mas diferencias entre las poblaciones de las especies de Sudáfrica oriental, el cálculo del valor de la variabilidad genética a nivel específico resulta ser superior.
- Hemos podido observar en las especies de Sudáfrica oriental que la variabilidad genética tiene una componente interpoblacional muy importante para explicar su distribución, igual como sucede con las especies de Sudáfrica occidental. En las especies del norte de África e Islas Canarias la principal componente para explicar distribución de la variabilidad genética es la intrapoblacional, tal y como ya se ha visto en los trabajos previos realizados con aloenzimas.
- Parece ser que la distribución de la variabilidad genética está más relacionada con factores histórico-ambientales que con su posición de proximidad filogenética. Aunque las especies del norte de África e Islas Canarias y las de Sudáfrica oriental

están estrechamente relacionadas filogenéticamente, el patrón de distribución de la variabilidad genética de las especies de Sudáfrica oriental es similar al de las especies de Sudáfrica occidental.

- Entre las dos subespecies de *A. albanense* se han obtenido elevados valores de diferenciación génica, corroborando así nuestra impresión de que puedan ser dos especies diferentes. Lo mismo sucede entre *A. asteroides* y *A. roseum*, dada la propuesta de tratarlas como dos subespecies de *A. roseum* propuesta por Müller-Doblies & Müller-Doblies (2002).
- Los análisis de distancias utilizando marcadores RAPD para establecer relaciones evolutivas han demostrado ser poco resolutivos. Ello se debe a que no tenemos la certeza de que bandas del mismo peso molecular compartidas por individuos de diferentes taxa procedan de la misma región genómica amplificada.

Capítulo 3

Filogenia del género *Androcymbium*

3.1 INTRODUCCIÓN

El estudio de las relaciones filogenéticas entre los diferentes grupos de taxa, nos permite entender las dinámicas evolutivas de estos y analizar sus congruencias y discrepancias teóricas utilizando diferentes algoritmos matemáticos y métodos estadísticos. El estudio filogenético de los taxa se inició a partir de la Teoría de la selección natural de Darwin hace casi 150 años, pero no empezaron a tener relevancia hasta hace 40 años, donde a partir del trabajo de Hennig (1966) estos estudios empezaron a tener mayor objetividad al plantear hipótesis evolutivas testables y falsables. En los últimos 10 años, el número de estudios filogenéticos se ha incrementado de forma espectacular debido a la aplicación de métodos estadísticos y a la implementación de nuevos y potentes algoritmos. Métodos y software que unidos a las enormes posibilidades de las nuevas y potentes computadoras han posibilitado complejos y rapidísimos cálculos. Pero este reciente auge se debe principalmente a dos factores: al cada vez más potente análisis computacional que ha permitido analizar inmensas cantidades de datos en muy poco tiempo y al descubrimiento de la enzima Taq-polimerasa, que ha propiciado incremento de datos procedentes del DNA de una forma impresionante. Gracias a esta enzima, se han desarrollado un gran número de técnicas moleculares que se han traducido en una fuente de generación de datos para estudios filogenéticos. El principal objetivo de este capítulo es realizar una completa filogenia molecular del género *Androcymbium*. La única filogenia molecular existente con este género es la realizada por Caujapé-Castells et al. (1999, 2001), donde se analizaron especies del norte de África y Sudáfrica occidental, utilizando la técnica cpDNA-RFLP y analizando los datos con métodos de máxima parsimonia. El estudio filogenético que se detalla en este capítulo, se ha realizado con especies del género *Androcymbium* de todas sus áreas de distribución (norte de África, Sudáfrica occidental, Sudáfrica oriental y Namibia), a partir de la secuenciación de regiones de DNA cloroplástico, mitocondrial y nuclear. Para obtener la filogenia, se analizaron los datos utilizando métodos de máxima parsimonia y de probabilidad condicional a posteriori (inferencia Bayesiana).

Los objetivos particulares del capítulo son:

(i) Realizar una filogenia completa del género *Androcymbium* a partir de la secuenciación de fragmentos del DNA cloroplástico, mitocondrial y nuclear.

(ii) Analizar la posición filogenética de las especies de Sudáfrica oriental y Namibia, nunca antes analizadas en estudios filogenéticos.

(iii) Resolver diferentes cuestiones taxonómicas del género con la ayuda de la filogenia molecular.

(iv) Investigar la biogeografía del género y establecer su región de origen.

(v) Datar de los procesos evolutivos utilizando la metodología del reloj molecular.

(vi) Comparar todos estos resultados con los obtenidos en estudios previos con este género y con otros géneros de igual distribución geográfica.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 Muestras analizadas

Se han analizado individuos de 75 poblaciones correspondientes a 29 especies del género *Androcymbium* (Colchicaceae) (Tabla 3.1). Este muestreo de especies representa todo el rango de variación conocido en *Androcymbium* y cubre toda la distribución geográfica del género en el continente africano. Como outgroups se han elegido 8 especies de la familia Colchicaceae, 5 de ellas correspondientes a la tribu *Colchiceae*, a la cual pertenece el género *Androcymbium* y una especie del género *Alstroemeria*, correspondiente a la familia Alstroemeriaceae (Dahlgren et al. 1985), la cual parece ser la más próxima filogenéticamente a las colchicáceas (Bremer 2000; Vinnersten & Bremer 2001; Vinnersten & Reeves 2003).

Todas las especies analizadas, fueron recogidas en su zona de origen entre los años 1989 y 2004, y se encuentran cultivadas como planta viva en los invernaderos de investigación del J.B.M.

3.2.2 Extracción de DNA

La extracción de DNA se hizo a partir de fragmentos de 1 cm² de hojas frescas procedentes de los individuos cultivados en el invernadero de investigación del J.B.M. Los trozos de hoja fueron deshidratados con gel de sílice previamente a la extracción. El DNA se extrajo siguiendo el método del CTAB (Doyle & Doyle 1987) incorporando las modificaciones de Li et al. (2001). Una vez finalizada la extracción se cuantificó con el espectrofotómetro GeneQuant II (Pharmacia) la concentración de DNA obtenida, así como la pureza del DNA extraído (ratio A_{260}/A_{280}) y la concentración de proteínas. El DNA fue conservado en tampón T.E. a -25°C .

Tabla 3.1: poblaciones del género *Androcymbium* y especies outgroups estudiadas en este capítulo. Se han analizado entre 3 y 7 individuos por población. Para la localización de las especies de Sudáfrica y Namibia se ha utilizado el *Degree Reference System* (Leistner & Morris 1976), sistema ampliamente utilizado por los biólogos Sudafricanos.

ESPECIE	LOCALIDAD	HAPLOTIPO	CÓDIGO
Norte de Africa			
1 <i>A. gramineum</i>	El Solanillo, Almería. ESPAÑA	1-2	JBM GR-ES
2 <i>A. gramineum</i>	Zonas Áridas, Almería. ESPAÑA	2	JBM GR-ZA
3 <i>A. gramineum</i>	Cerro de San Cristóbal, Almería. ESPAÑA	1-2	JBM GR-SC
4 <i>A. gramineum</i>	Los Molinos, Almería. ESPAÑA	2	JBM GR-LM
5 <i>A. gramineum</i>	Cerro de los Peligros, Almería. ESPAÑA	1	JBM GR-CP
6 <i>A. gramineum</i>	Barranco de Curriá, Almería. ESPAÑA	1	JBM GR-BC
7 <i>A. gramineum</i>	El Barranquete, Almería. ESPAÑA	1	JBM GR-EB
8 <i>A. gramineum</i>	Playas de Monsul, Almería. ESPAÑA	2	JBM GR-PM
9 <i>A. gramineum</i>	Cerro de los Lobos, Almería. ESPAÑA	2	JBM GR-CL
10 <i>A. gramineum</i>	Charco del Lobo, Almería. ESPAÑA	1	JBM GR-CH
11 <i>A. gramineum</i>	Aïn Harrouda. MARRUECOS	2	JBM GR-AH
12 <i>A. gramineum</i>	Casablanca. MARRUECOS	2	JBM GR-CA
13 <i>A. gramineum</i>	Oualidia. MARRUECOS	2	JBM GR-OU
14 <i>A. gramineum</i>	Cap Beddouza. MARRUECOS	2	JBM GR-CB
15 <i>A. gramineum</i>	Safi. MARRUECOS	2	JBM GR-SA
16 <i>A. hierrense</i>	El Hierro, Islas Canarias. ESPAÑA		JBM HI-HI
17 <i>A. hierrense</i>	La Palma, Islas Canarias. ESPAÑA		JBM HI-LP
18 <i>A. hierrense</i>	Gomera, Islas Canarias. ESPAÑA		JBM HI-GO
19 <i>A. palaestinum</i>	Beit Shean Valley. ISRAEL		JBM PA-BS
20 <i>A. palaestinum</i>	Desierto de Dimona. ISRAEL		JBM PA-DI
21 <i>A. psammophilum</i>	Lanzarote, Islas Canarias. ESPAÑA		JBM PS-LA
22 <i>A. psammophilum</i>	Fuerteventura, Islas Canarias. ESPAÑA		JBM PS-FU
23 <i>A. rechingeri</i>	Elafonisos, Creta. GRECIA		JBM RE-EL
24 <i>A. wyssianum</i>	Essaouira. MARRUECOS	2	JBM WY-EA
25 <i>A. wyssianum</i>	Fonts Bleus de Maski. MARRUECOS	1	JBM WY-FB
26 <i>A. wyssianum</i>	Er Foud. MARRUECOS	1	JBM WY-EF
27 <i>A. wyssianum</i>	Figuig. MARRUECOS	1	JBM WY-FI
28 <i>A. wyssianum</i>	Taghit - Iqli. ARGELIA	1	JBM WY-TI
29 <i>A. wyssianum</i>	Aïn Ouarka. ARGELIA	1	JBM WY-AO
29 <i>A. wyssianum</i>	Nefta1. TÚNEZ	1	JBM WY-N1
30 <i>A. wyssianum</i>	Nefta2. TÚNEZ	1	JBM WY-N2
Sudáfrica Occidental			
31 <i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i>	3219AA Wuppertal.		JBM ALBA-PK
32 <i>A. austrocapense</i>	3418AC Simonstown.	2	JBM AUST-GH
33 <i>A. austrocapense</i>	3418AD Simomstown.	2	JBM AUST-WP
34 <i>A. bellum</i>	2817DC Vioolsdrif.		JBM BELL-VI
35 <i>A. burchellii</i> subsp. <i>burchellii</i>	3319BC Worcester.		JBM BURC-HX
36 <i>A. burchellii</i> subsp. <i>pulchrum</i>	3119DA Calvinia.	1	JBM BURC-CA
37 <i>A. burchellii</i> subsp. <i>pulchrum</i>	3119AA Calvinia.	2	JBM BURC-NI
38 <i>A. capense</i>	3318AB Cape Town.		JBM CAPE-HO
39 <i>A. ciliolatum</i>	Silverhill Seeds.		JBM CILI-VS
40 <i>A. circinatum</i>	2917DB Springbok.	1	JBM CIRC-NB
41 <i>A. circinatum</i>	2917DB Springbok.	2	JBM CIRC-SB

Tabla 3.1: (cont.)

ESPECIE	LOCALIDAD	HAPLOTIPO	CÓDIGO
42 <i>A. cuspidatum</i>	3119DA Calvinia.		JBM CUSP-CA
43 <i>A. cuspidatum</i>	3320CD Montagu.		JBM CUSP-MO
44 <i>A. dregei</i>	3219AA Wuppertal.		JBM DREG-PK
45 <i>A. eghimocymbion</i>	3218DB Clanwilliam.		JBM EGHI-CI
46 <i>A. eghimocymbion</i>	3219AA Wuppertal.		JBM EGHI-PK
47 <i>A. hantamense</i>	3119DA Calvinia.		JBM HANT-CA
48 <i>A. henssenianum</i>	2817CC Vioolsdrif.		JBM HENS-EK
49 <i>A. huntleyi</i>	2917AD Springbok.	1	JBM HUNT-EK1
50 <i>A. huntleyi</i>	2917AD Springbok.	2	JBM HUNT-EK3
51 <i>A. irroratum</i>	2917AD Springbok.	1	JBM IRRO-EK
52 <i>A. irroratum</i>	2917AD Springbok.	2	JBM IRRO-EK2
53 <i>A. irroratum</i>	2817CC Vioolsdrif.	2	JBM IRRO-EK6
54 <i>A. irroratum</i>	3018CB Kamiesberg.	4	JBM IRRO-KA
55 <i>A. irroratum</i>	3118BC Vanrhynsdor.	5	JBM IRRO-KW
56 <i>A. irroratum</i>	3119AC Calvinia.	3	JBM IRRO-VP
57 <i>A. irroratum</i>	3118AD Vanrhynsdor.	3	JBM IRRO-VY
58 <i>A. poeltianum</i>	2917DB Springbok.	1	JBM POEL-NB
59 <i>A. poeltianum</i>	2917DB Springbok.	1	JBM POEL-CO
60 <i>A. poeltianum</i>	2917DC Springbok.	2	JBM POEL-ST
61 <i>A. villosum</i>	2817CC Vioolsdrif.		JBM VILL-EK
62 <i>A. villosum</i>	2917DC Springbok.		JBM VILL-ST
63 <i>A. walteri</i>	2917DC Springbok.		JBM WALT-ST
Sudáfrica Oriental			
64 <i>A. albanense</i> subsp. <i>albanense</i>	3326AB Grahamstown.		JBM ALBA-SW
65 <i>A. austrocapense</i>	3325DC Skoenmakerskop.	1	JBM AUST-CR
66 <i>A. austrocapense</i>	3325DC Skoenmakerskop.	1	JBM AUST-SB
67 <i>A. decipiens</i>	2832BB Mtubatuba.		JBM DECI-SL
68 <i>A. leistneri</i>	2926AA Bloemfontein.	1	JBM LEIS-BG
69 <i>A. leistneri</i>	2926AA Bloemfontein.	2	JBM LEIS-BL
70 <i>A. longipes</i>	3325CC Port Elizabeth.		JBM LONG-ZU
Namibia			
71 <i>A. asteroides</i>	2518AD Tses.		JBM ASTE-GO
72 <i>A. asteroides</i>	2519BB Koes.		JBM ASTE-TW
73 <i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	2316BA Nauchas.	1	JBM MELA-GA
74 <i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	2117BD Otjosundu.	2	JBM MELA-OT
75 <i>A. roseum</i>	2216AD Otjimbingwe.		JBM ROSE-FB
Outgroups			
<i>Alstroemeria aurantiaca</i>	Jardín Botánico de Valdivia. CHILE.		JBM ALS-AUR
<i>Baeometra uniflora</i>	3418AB Simonstown. SUDÁFRICA.		JBM BAE-UNI
<i>Bulbocodium vernum</i>	Huesca. ESPAÑA.		JBM BUL-VER
<i>Colchicum lusitanum</i>	Cadiz. ESPAÑA		JBM COL-LUS
<i>Gloriosa superba</i>	JB Marimurtra. ESPAÑA. (origen Sudafricano)		JBM GLO-SUP
<i>Merendera androcymbioides</i>	Málaga. ESPAÑA.		JBM MER-AND
<i>Merendera filifolia</i>	Mallorca. ESPAÑA.		JBM MER-FIL
<i>Merendera montana</i>	Huesca. ESPAÑA.		JBM MER-MON
<i>Onixotis stricta</i>	Silverhill Seeds. SUDÁFRICA		JBM ONI-STR

Fig. 3.1: localización de las poblaciones analizadas. Números de las poblaciones indicados en la tabla 3.1.

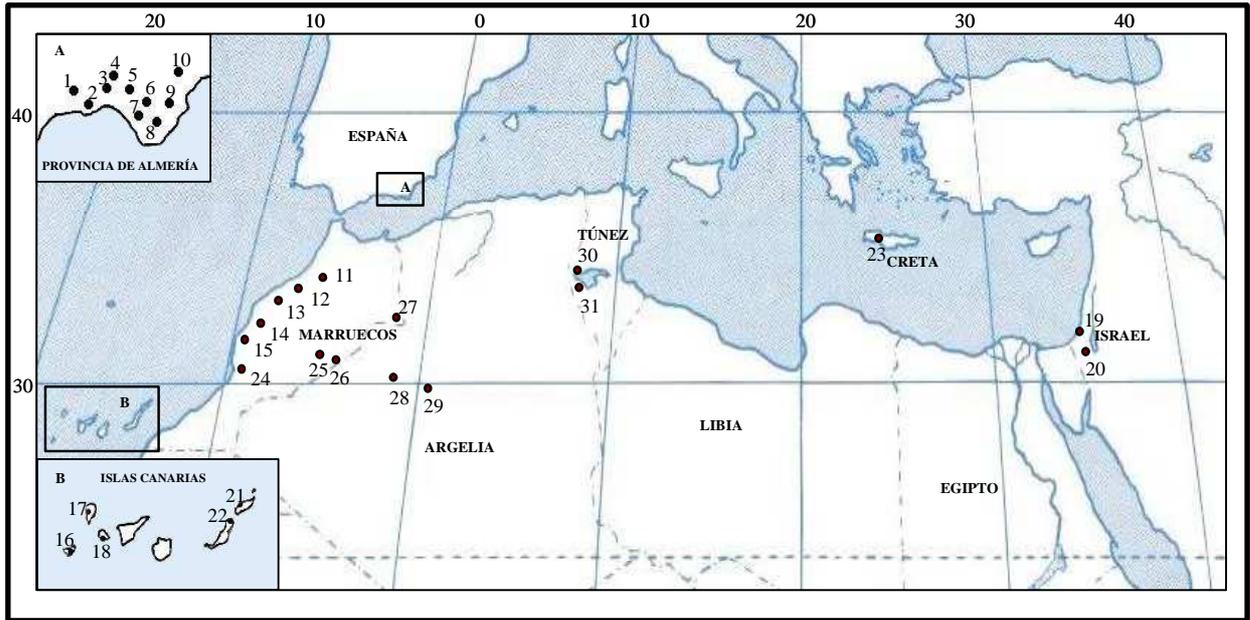


Fig. 3.1a: norte de África.

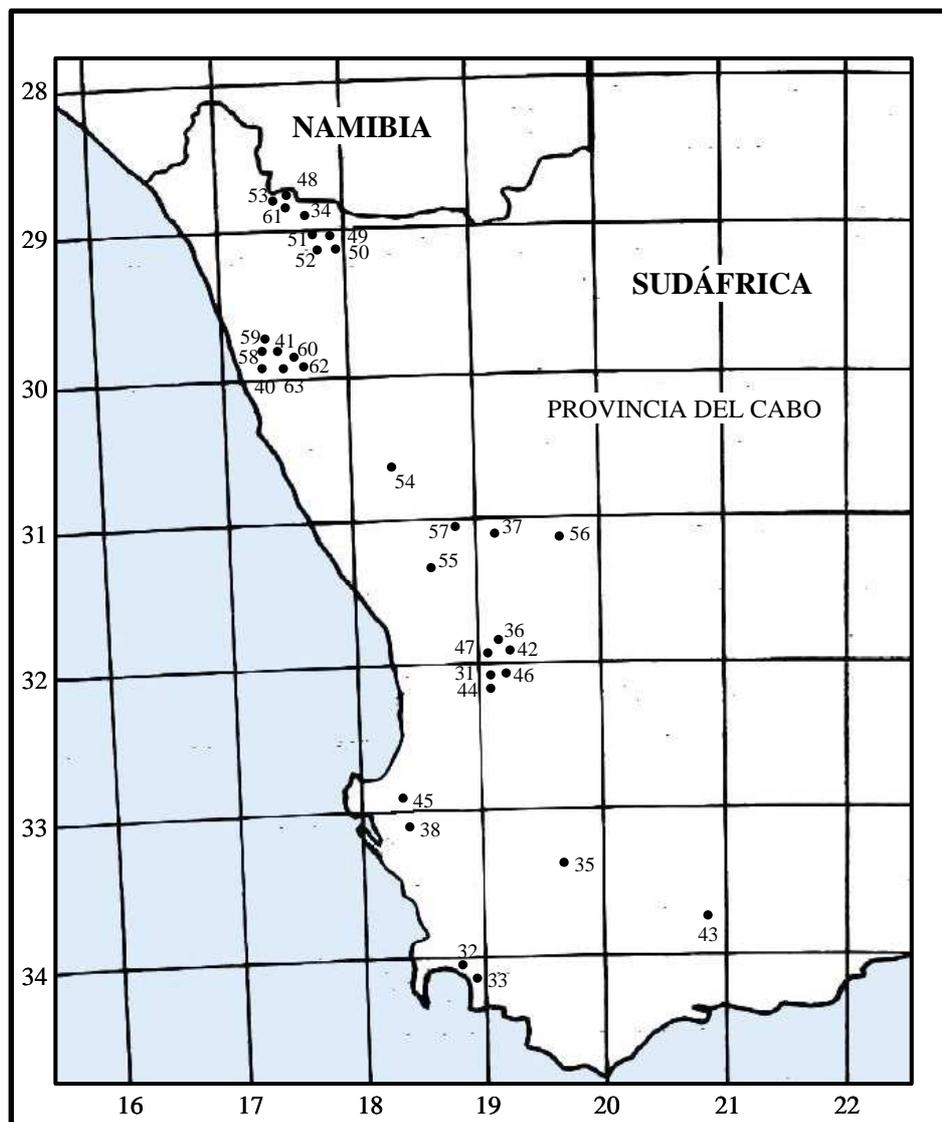


Fig. 3.1b: Sudáfrica occidental

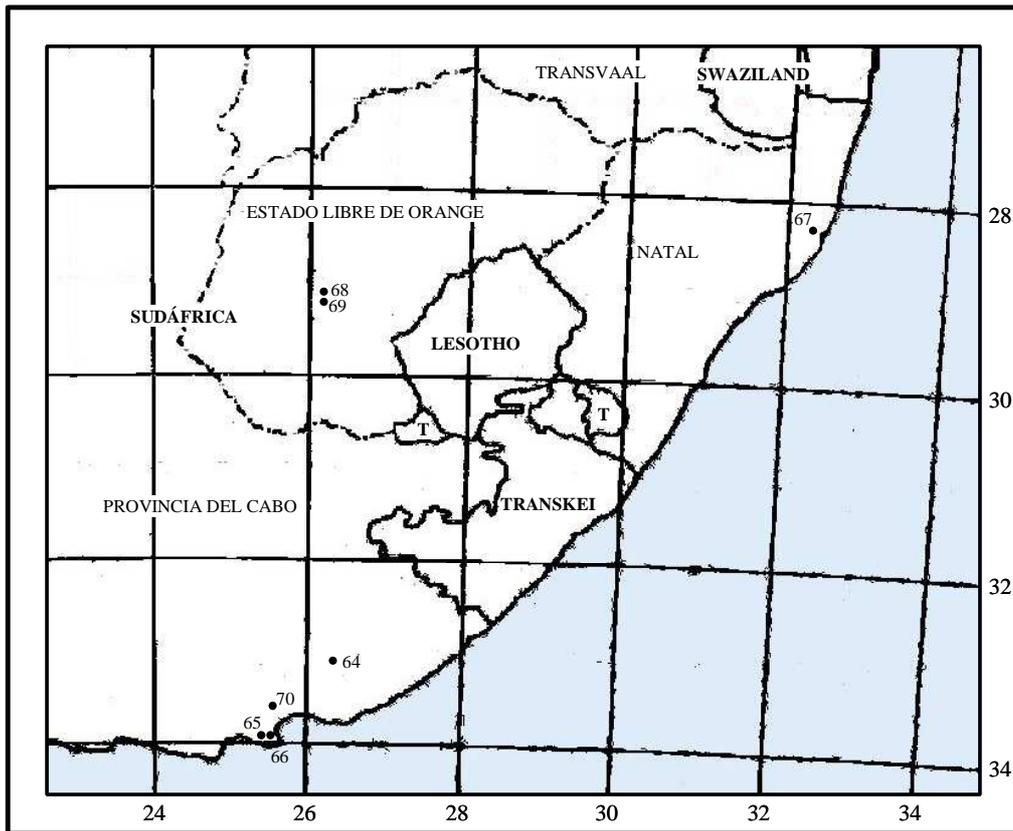


Fig. 3.1c: Sudáfrica oriental. T: Transkei

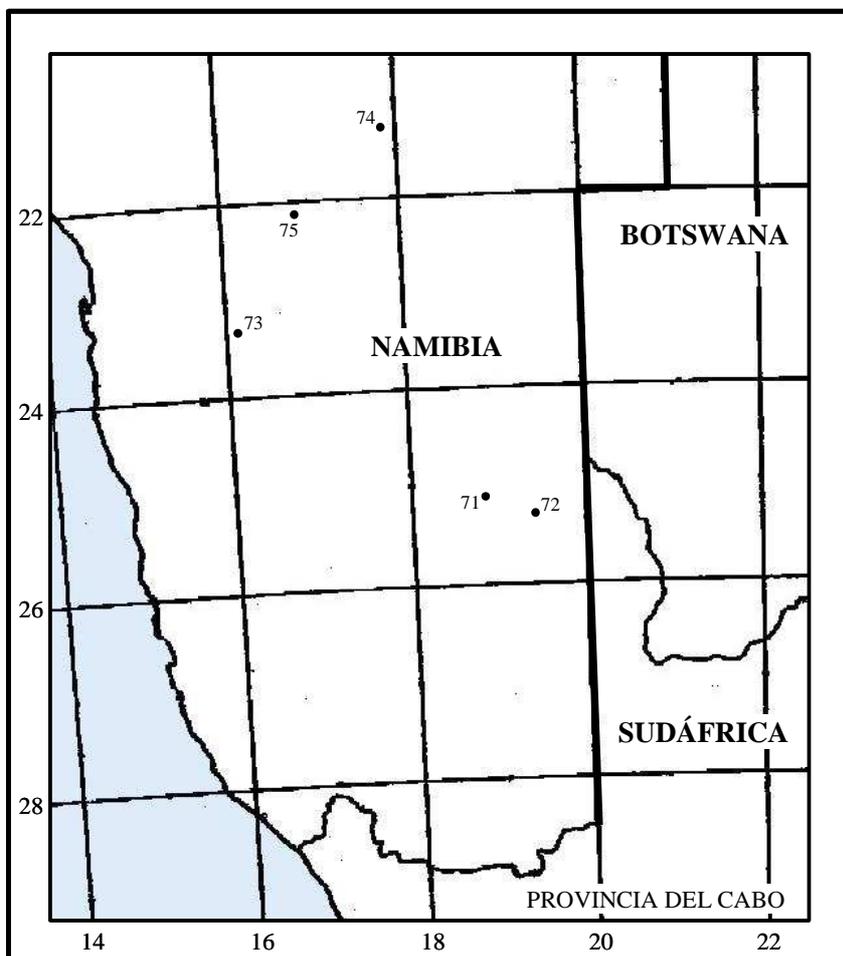


Fig. 3.1d: Namibia

3.2.3 Marcadores moleculares

3.2.3.1 GENES CLOROPLÁSTICOS

Como se ha visto en diferentes estudios filogenéticos (Taberlet et al. 1991; Gielly & Taberlet 1994; Demesure et al. 1995; Small et al. 1998) las diferentes regiones del DNA cloroplástico son muy útiles para realizar estudios filogenéticos a niveles interespecífico e intraespecífico debido a su alta tasa evolutiva.

La primera zona elegida para hacer el estudio fue la comprendida entre los genes *trnT* y *trnF* (Fig. 3.2). Esta zona, además de los genes que codifican para el tRNA de la treonina (*trnT*), el tRNA de la leucina (*trnL*) y el tRNA de la fenilalanina (*trnF*), cuenta con varios cientos de bases de DNA no codificante entre estos genes y dentro del intrón del gen *trnL* (Taberlet et al. 1991). Para amplificar esta región, Taberlet et al. (1991) realizaron las secuencias de los cebadores a partir de las regiones conservadas de los genes tRNA de esta región. Utilizando estos cebadores obtuvieron amplificaciones en diferentes grupos de plantas terrestres, tanto en briofitos y pteridofitos como en gimnospermas y angiospermas. En nuestro caso, se amplificaron tres fragmentos no codificantes dentro de esta zona: el espacio intergénico entre los genes *trnT* y *trnL* (*trnT-trnL* IGS), el intrón del gen *trnL* (*trnL* intrón) y el espacio intergénico entre los genes *trnL* y *trnF* (*trnL-trnF* IGS) utilizando los pares de cebadores a – b, c – d y e – f, diseñados por Taberlet et al. (1991) (Tabla 3.2).

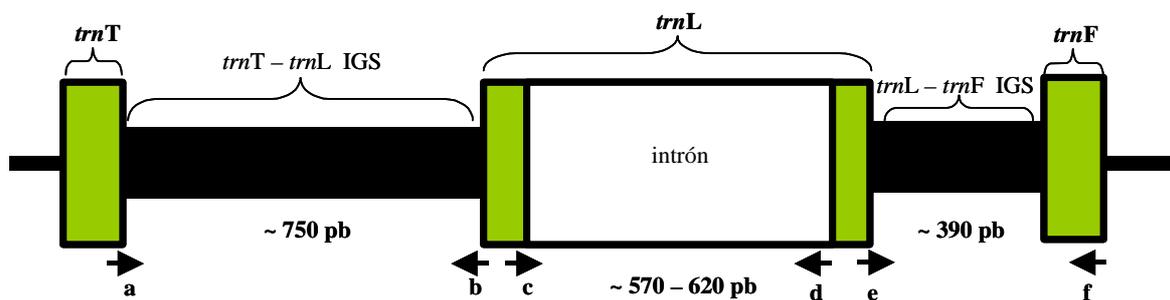


Fig. 3.2: regiones de cpDNA amplificadas con los cebadores de Taberlet et al. (1991)

Otra región del DNA cloroplástico con la que se trabajó fue el gen *matK*, que codifica para la proteína maturasa. Esta tiene una longitud aproximada de 1500 pb y

se encuentra localizada dentro del intrón del gen *trnK* (gen que codifica para el tRNA de la lisina) (Fig. 3.3). El gen *matK* fue elegido porque presenta una alta tasa evolutiva, tres veces la del gen *rbcL*, gen que codifica por la subunidad grande de la proteína RUBISCO (Johnson & Soltis 1994), y porque se ha comprobado su utilidad para realizar filogenias a nivel interespecífico (Sang et al. 1997b; Fukuda et al. 2001; Cronn et al. 2002). Esta es la región codificante mas variable de todo el DNA cloroplástico (Neuhaus & Link 1987; Olmstead & Palmer 1994). Para su amplificación se utilizaron los cebadores *trnK*-710F y *trnK*-2R (Koch et al. 2001) (Tabla 3.2).



Fig. 3.3: gen *matK* dentro del intrón del gen *trnK*.

Estas dos regiones cloroplásticas han sido utilizadas para realizar el 77% de los estudios de sistemática vegetal realizados entre los años 1995 y 2002 (Shaw et al. 2005). Han dado resultados satisfactorios resolviendo filogenias a bajos niveles taxonómicos en algunos grupos (Bellstedt et al. 2001; Ge et al. 2002), aunque también han resultado ser poco resolutivas en otros grupos, sobretudo a la hora de resolver clados formados por especies estrechamente relacionadas (Bell & Patterson 2000; Cuénoud et al. 2000; Hardig et al. 2000; Goldblatt et al. 2002; Klak et al. 2003; Muellner et al. 2003; Samuel et al. 2003). Por ello, muchos autores recomiendan que, para obtener una mejor resolución filogenética, los datos de estos populares fragmentos deben ser combinados con otros datos cloroplásticos o de otros genomas (Sang et al. 1997b; Wang et al. 1999; Hardig et al. 2000; Kusumi et al. 2000; Azuma et al. 2001; Bortiri et al. 2001; Soltis et al. 2001; Bayer et al. 2002; Cronn et al. 2002; Hartmann et al. 2002; Mast & Givnish 2002; Nyffeler 2002; Schönenberger & Conti 2003; Yamane et al. 2003), ya que la adición de nuevos datos es requerida habitualmente para generar hipótesis filogenéticas con una aceptable resolución. Por ello, para analizar la filogenia del género *Androcymbium*, se decidió estudiar otras

nuevas regiones no codificantes de DNA cloroplástico. Una de estas regiones no codificante fue el espacio intergénico entre los genes *trnH* y *psbA* (*trnH-psbA* IGS). El gen *trnH* codifica para el tRNA de la histidina, mientras que el gen *psbA* lo hace para el polipéptido D1 del centro de reacción del fotosistema II. Esta región fue elegida porque se ha comprobado que puede ser fácilmente amplificada y secuenciada en todos los linajes de plantas (Shaw et al. 2005). Debido a su longitud (≈ 500 bp) sólo es necesario utilizar un cebador para secuenciarla y se ha demostrado que es mas variable que el gen *matK* y la región *trnL-trnF* IGS (Sang et al. 1997). Además, ha sido recientemente propuesta para identificar a las angiospermas dentro del proyecto DNA *barcodes* (Kress et al. 2005). Para su amplificación se usaron los cebadores *trnH* (Tate & Simpson 2003) y *psbA* (Sang et al. 1997). El *trnH-psbA* IGS ha sido utilizado para estudiar géneros y especies estrechamente relacionados (Azuma et al. 1999; Chandler et al. 2001; Mast & Givnish 2002; Fukuda et al. 2003; Miller et al. 2003; Tate & Simpson 2003) e incluso para estudios intraespecíficos (Holdregger & Abbott 2003). Un estudio realizado recientemente por Shaw et al. (2005), donde se comparan los niveles de variación de 21 zonas no codificantes de DNA cloroplástico en diferentes grupos de angiospermas y gimnospermas, indica que en monocotiledóneas la zona con mas PICs (*potentially informative characters*: (NS+ID+IV), donde NS = nº de sustituciones nucleotídicas, ID = nº de indels, IV = nº de inversiones) es precisamente esta (*trnH-psbA* IGS). Los extremos de esta región son bastante conservados, lo cual implica la posibilidad de diseñar cebadores universales, mientras que la porción media de la secuencia es propensa a contener pequeñas inserciones o deleciones (indels) (Aldrich et al. 1988; Shaw et al. 2005).

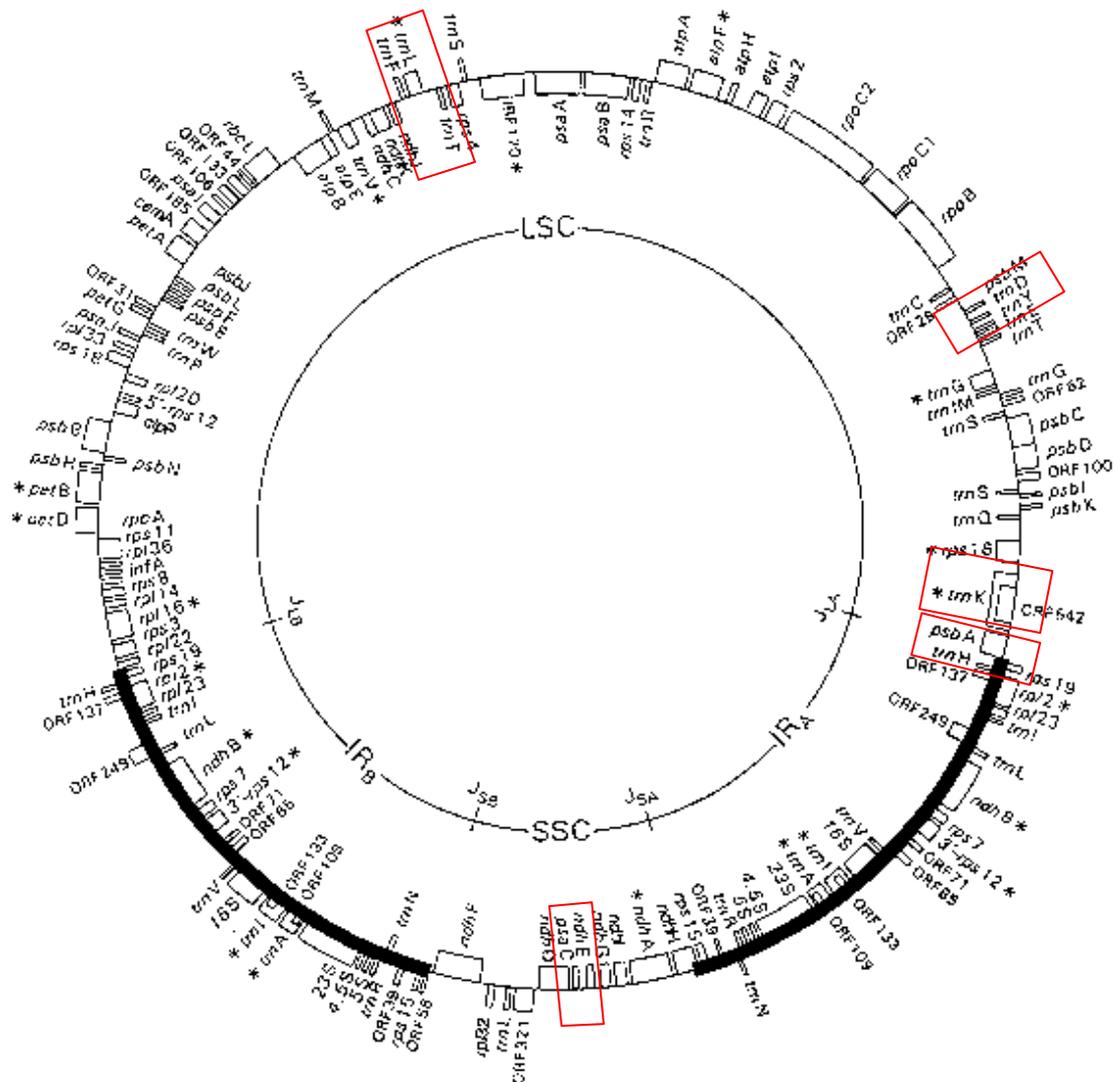


Fig. 3.4: molécula de DNA cloroplástico. En rojo regiones seleccionadas para realizar la filogenia. LSC: *large single copy region*; SSC: *small single copy region*; IR: *inverted repeat region*.

Las tres regiones anteriormente citadas se encuentran muy cercanas dentro de la molécula de DNA cloroplástico (Fig. 3.4). Con el objetivo de innovar y experimentar con otras zonas no codificantes del DNA cloroplástico y encontrar nuevas zonas con mayor número de PICs, se eligieron otros dos fragmentos nunca antes utilizados en estudios filogenéticos. Se intentó que estos se localizaran en diferentes zonas dentro del DNA cloroplástico respecto a los fragmentos anteriormente seleccionados con tal de tener muestreo mas amplio dentro de la molécula de DNA. Estos dos novedosos fragmentos fueron el espacio intergénico entre los genes *psaC* y *ndhE* (*psaC-ndhE* IGS), y el espacio intergénico entre los genes *trnY* y *trnD* (*trnY-trnD* IGS). El gen *psaC* codifica para la subunidad VII del fotosistema I y el gen *ndhE* codifica para la subunidad 4L de la NADH

deshidrogenasa. El gen *trnY* codifica para el tRNA de la tirosina y el gen *trnD* codifica para el tRNA del ácido aspártico. El diseño de los cebadores para amplificar estos fragmentos no codificantes se hizo a partir de las secuencias del DNA cloroplástico depositadas en el GenBank de *Triticum aestivum* (NC_002762), *Oryza sativa* (NC_001320), *Zea mays* (NC_001666) y *Lotus japonicus* (NC_002694), eligiendo zonas de los genes que no fueran variables entre estas especies para poder diseñar cebadores universales. Los cebadores diseñados fueron *psaC_F* y *ndhE_R* para amplificar el *psaC-ndhE* IGS, y *trnY_F* y *trnD_R* para amplificar el *trnY-trnD* IGS (Tabla 3.2).

3.2.3.2 GENES MITOCONDRIALES

Los genes mitocondriales son raramente usados para estudios filogenéticos en plantas porque, a diferencia de en los animales, muestran una baja tasa de sustitución nucleotídica y frecuentemente presentan modificaciones estructurales (Palmer 1992; Palmer et al. 2000). No obstante, hay algunos casos donde los genes mitocondriales han sido útiles para resolver filogenias a bajo nivel taxonómico (Tomaru et al. 1998; Sanjur et al. 2002; Bakker et al. 2000, 2004; Renner & Zhang 2004).

En base al trabajo de Duminil et al. (2002) se eligieron tres regiones del DNA mitocondrial para realizar esta filogenia. Estas regiones fueron el gen *ccmF2*, que codifica para la proteína relacionada con la biogénesis de la proteína *ccmF* del citocromo B, el gen *cox3*, que codifica para la subunidad 3 de la citocromo oxidasa, y el intrón 2 del gen *nad1*, gen que codifica para la subunidad 1 de la NAD(P)H deshidrogenasa. Este último gen ha demostrado ser útil para realizar filogenias a bajo nivel taxonómico (Freudenstein & Chase 2001; Bakker et al. 2004; Renner & Zhang 2004). Se eligieron estas zonas porque tenían un tamaño razonable para ser secuenciadas, entre 500 y 1000 pb en *Arabidopsis thaliana* (Y08501), y porque presentaban una eficiencia de amplificación del 100% en las 28 especies de angiospermas estudiadas en el trabajo de Duminil et al. (2002). Los cebadores utilizados fueron *ccb203_F* y *ccb203_R* para amplificar el gen *ccmF2*, *cox3_F* y *cox3_R* para amplificar el gen *cox3*, y *nad1/2* y *nad1/3* para amplificar el intrón 2 del gen *nad1* (Tabla 3.2).

3.2.3.3 GENES NUCLEARES

Tanto los genes cloroplásticos como los mitocondriales tienen herencia monoparental y, en angiospermas, generalmente es materna (Gillham 1994; Mogensen 1996). Cuando se hace una filogenia utilizando genes de estos genomas con herencia monoparental, se hace la filogenia de una línea genética, materna o paterna según el caso, obviándose de esta forma una posible evolución reticulada del linaje o posibles episodios de hibridización. Utilizando genes nucleares, que tienen herencia biparental, se puede descubrir esta posible evolución reticulada, episodios de hibridización y, a su vez, comprobar también si la evolución de los genomas haploides dentro del linaje es congruente¹ con la evolución del genoma nuclear.

Las primeras filogenias utilizando genes nucleares se empezaron a realizar a mediados de los 90 con marcadores como el gen que codifica para la alcohol deshidrogenasa (*Adh*) (Miysashita et al. 1996; Morton et al. 1996; Sang et al. 1997; Clegg et al. 1997), el gen de la fosfoglucoasa isomerasa citosólica (*PgiC*) (Gottlieb & Ford 1996), el intrón del gen que codifica para la histona H3 (Doyle et al. 1996), y la subunidad pequeña de la RUBISCO (*rbcS*) y la chalcona sintasa (*Chs*) (Clegg et al. 1997) entre otros.

Siguiendo las directrices de Sang (2002), para analizar la filogenia del género *Androcymbium* (Colchicaceae) se eligieron diferentes regiones no codificantes (intrones) de genes de copia única o de baja copia. Una de las ocho zonas inicialmente elegidas fue el intrón 23 del gen que codifica para la subunidad 2 de la RNA polimerasa (RNApol2_i23). Este intrón ha demostrado ser útil resolviendo filogenias a bajo nivel taxonómico en estudios realizados con monocotiledóneas (Lewis, com. pers.). Para amplificarlo se usaron los cebadores RPB2-P10F y RPB2-M11Rr (Tabla 3.2). La segunda región elegida fue el fragmento cromosómico entre el exón 10 y el exón 15 del gen nuclear de copia única DMC1 (*disrupted meiotic cDNA1*), que codifica para una proteína implicada en la meiosis. Esta región ha demostrado ser útil para resolver filogenias entre especies de la tribu *Triticeae* (Poaceae) (Petersen

¹ Congruencia filogenética: es el nivel de concordancia existente entre estimaciones de una filogenia basada en diferentes conjuntos de datos. Existe congruencia filogenética si los diferentes conjuntos de datos producen topologías similares del árbol filogenético, indicando pues que reflejan una misma historia evolutiva (Page & Holmes 1998).

& Seberg 2002, 2003, 2004). Los cebadores utilizados fueron TDMC1e10 y TDMC1e15R.

Otro gen de copia única utilizado fue el gen *waxy*, que codifica para la proteína GBSSI (*granule-bound starch synthase*). En monocotiledóneas se ha trabajado con la zona entre los exones 8 y 13 de gen (Mason-Gamer et al. 1998), y se han obtenido buenos resultados en estudios filogenéticos con especies de la familia Poaceae (Ingram & Doyle 2003). En otros estudios filogenéticos con especies de la familia Rosaceae, se pudo observar que este gen estaba duplicado (Evans et al. 2000; Evans & Campbell 2002). Los cebadores utilizados fueron F-for y M-bac.

El gen que codifica para la malato sintasa se ha observado que puede ser muy útil para hacer estudios filogenéticos a bajo nivel taxonómico debido a la variabilidad de sus intrones (Lewis & Doyle 2001, 2002). En nuestro caso se trabajó con la región entre el exón 1 y el exón 3 de este gen utilizando los cebadores ms400f y ms943r.

Otro gen de copia única muy utilizado para realizar filogenias en plantas y utilizado para hacer nuestro estudio fue el gen *nepGS* (*chloroplast-expressed glutamine synthetase*) (Emshwiller & Doyle 1999; Perret et al. 2003). La zona escogida está comprendida entre los exones 7 y 11, y se utilizaron los cebadores GScp687f y GScp994r.

Otros genes de copia única utilizados en este trabajo fueron el gen *LEAFY* y el gen que codifica para la nitrato reductasa. Estos genes, aunque no son ampliamente utilizados, han demostrado ser útiles para resolver filogenias a nivel de género (Howarth & Baum 2002; Oh & Potter 2003). Del gen *LEAFY*, que regula el establecimiento y la identidad del meristemo floral, y la época de floración en *Arabidopsis* (Blázquez et al. 1997), se estudió el intrón 2 y su amplificación se realizó utilizando los cebadores LFY1 y LFY2. Del gen nitrato reductasa se analizó el intrón 2 utilizando los cebadores NIA_i3f y NIA_i3r para su amplificación

Tabla 3.2: secuencias de los cebadores utilizados para amplificar las diferentes regiones genómicas en este estudio.

Región	Cebador	Secuencia (5'-3')	Referencia
cpDNA			
<i>trnT-trnL</i> IGS	<i>trnLa</i>	CATTACAAATGCGATGCTCT	Taberlet et al. 1991
	<i>trnLb</i>	TCTACCGATTTCCGCATATC	Taberlet et al. 1991
<i>trnL</i> intrón	<i>trnLc</i>	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet et al. 1991
	<i>trnLd</i>	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	Taberlet et al. 1991
<i>trnL-trnF</i> IGS	<i>trnLe</i>	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	Taberlet et al. 1991
	<i>trnLf</i>	ATTTGAACTGGTGACACGAG	Taberlet et al. 1991
<i>trnY-trnD</i> IGS	<i>trnYf</i>	TCTACGCTGGTTCAAATCCAG	del Hoyo, este estudio
	<i>trnDr</i>	AACCCGCAGTTCGCCTT	del Hoyo, este estudio
<i>mat K</i>	<i>trnK710f</i>	CGCACTATGTGTCATTCAGAACTC	Koch et al. 2001
	<i>trnK2r</i>	CTCCATCCGACTAGTTCGGG	Koch et al. 2001
<i>trnH-psbA</i> IGS	<i>trnH</i>	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	Tate & Simpson 2003
	<i>psbA</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang et al. 1997b
<i>psaC-ndhE</i> IGS	<i>psaCf</i>	TGAGTGCATCCTATACATGTAT	del Hoyo, este estudio
	<i>ndhEr</i>	ATTCTTTCTCCATCCATCGTA	del Hoyo, este estudio
nDNA			
<i>RNApolimerasa2</i> , intrón 23	RPB2-P10F	CARGARGATATGCCATGGAC	Lewis, com. pers.
	RPB2-M11Rr	CCACGCATCTGATATCCAC	Lewis, com. pers.
<i>DMC1</i> , exón 10 a 15	TDMC1e10	TGCCAATTGCTGAGAGATTTG	Petersen & Seberg 2002
	TDMC1e15R	AGCCACCTGTTGTAATCTGG	Petersen & Seberg 2002
<i>waxy</i> , exón 8 a 13	F-for	TGCGAGCTCGACAACATCATGCC	Mason-Gamer et al. 1998
	M-bac	GGCGAGCGGCGGATCCCTCGCC	Mason-Gamer et al. 1998
malato sintasa, exón 1 a 3	ms400f	GGAAGATGRTCATCAAYGCNCTYAAATC	Lewis & Doyle 2001
	ms943r	GTCTTNACRTAGCTGAADATRTARTCCC	Lewis & Doyle 2001
<i>ncpGS</i> , exón 7 a 11	GScp687f	GATGCTCACTACAAGGCTTG	Emshwiller & Doyle 1999
	GScp994r	AATGTGCTCTTTGTGGCGAAG	Emshwiller & Doyle 1999
<i>LEAFY</i> , intrón 2	LFY1	CACCCACGACCITTYATIGTIAICIGARCCIGGIGA	Howarth & Baum 2002
	LFY2	CCTGCCIACTARTGICKCATYTTIGGYTT	Howarth & Baum 2002
nitrato reductasa, intrón 2	NIA_i3f	AARTAYTGGTGYTGGTGYTTYTGGTC	Oh & Potter 2003
	NIA_i3r	GAACCARCARTTGTTCATCATDCC	Oh & Potter 2003
<i>DFR</i> , exón 1 a 4	DFR_e1F	AGCCACCTGTTGTAATCTGG	del Hoyo, este estudio
	DFR_e4R	TGYTSAGGAAAGGCAAAGG	del Hoyo, este estudio
mtDNA			
<i>ccmF2</i>	<i>ccb203_F</i>	ASGTTTCTACGGACCGATGCC	Duminil et al. 2002
	<i>ccb203_R</i>	CACGGGGAGGGAGCRGGCGA	Duminil et al. 2002
<i>cox3</i>	<i>cox3_F</i>	CCGTAGGAGGTGTGATGT	Duminil et al. 2002
	<i>cox3_R</i>	CTCCCCACCAATAGATAGAG	Duminil et al. 2002
<i>nad1</i> , intrón 2	<i>nad1/2</i>	GCATTACGATCTGCAGCTCA	Demesure et al. 1995
	<i>nad1/3</i>	GGAAGCCGATTAGTTTCTGC	Demesure et al. 1995

Finalmente, y a partir de las secuencias de DNA depositadas en el GenBank, se buscó un octavo gen nuclear de copia única con el fin de encontrar un buen marcador y comprobar su utilidad para hacer estudios filogenéticos en plantas. Siguiendo los consejos de Sang (2002) para determinar genes nucleares útiles para estudios filogenéticos en plantas, se eligió el gen *DFR*, que codifica por la proteína dihidroflavonol reductasa. Esta proteína forma parte de la ruta de síntesis de los taninos y antocianos (Fig. 3.5), pigmentos localizados en las vacuolas de las plantas.

El diseño de los cebadores se hizo a partir de las regiones conservadas de las secuencias de *DFR* depositadas en el GenBank de *Triticum aestivum* (AY208998), *Allium cepa* (AY221250), *Thinopyrum ponticum* (AY208997) y *Oryza sativa* (AB003495), todas ellas monocotiledóneas. Se eligió la zona entre los exones 1 y 4 debido a que las secuencias de estos exones eran lo bastante conservadas como para diseñar cebadores universales siguiendo las directrices de Sang (2002). Los cebadores fueron DFR_e1F y DFR_e4R.



Fig. 3.5: ruta biosintética de taninos y antocianos donde interviene la enzima DFR.

3.2.4 Condiciones de amplificación

3.2.4.1 GENES CLOROPLÁSTICOS

Para un volumen de amplificación de 50 µl se trabajó a 1x PCR buffer (Bioline), 4 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,1 mM de cada dNTP (Bioline), 0,4µM de cada cebador (Eurogentec), 1U de Taq-polimerasa Biotaq (Bioline) y 250 ng de DNA. Para realizar la amplificación de las regiones no codificantes del cpDNA seleccionadas, se

empezó con un paso de activación de la Taq-polimerasa de 3' a 92°C, seguido por 30 ciclos de 30" a 92°C para desnaturalizar el DNA, de 20" a 30" para la hibridación de los cebadores y 30" a 72°C para la elongación, acabando con un paso de 1' a 72°C. Las condiciones de hibridación varían en función de la región que estemos amplificando. Las condiciones óptimas de amplificación fueron de 20" a 57°C para el *trnT-trnL* IGS, 30" a 58°C para el *trnL* intrón, 20" a 64°C para el *trnL-trnF* IGS, 30" a 62°C para el *trnH-psbA* IGS y 20" a 63°C para el *trnY-trnD* IGS.

3.2.4.2 GENES MITOCONDRIALES

Para amplificar el intrón 2 del gen *nad1* y el gen *cox3* se trabajó con un volumen de amplificación de 50 µl a 1x PCR buffer (Bioline), 2 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,15 mM de cada dNTP (Bioline), 0,4µM de cada cebador (Invitrogen), 1 U de Taq-polimerasa Biotaq (Bioline) y 25 ng de DNA. Para amplificar el gen *ccmF2* se trabajó a 1,5 mM de MgCl₂. Para realizar la amplificación del intrón 2 del gen *nad1* y del gen *cox3*, se empezó con un paso de activación de la Taq-polimerasa de 3' a 94°C, seguidas por 30 ciclos de 45" a 94°C para desnaturalizar el DNA, 45" a 59°C para el anillamiento de los cebadores y 1' a 72°C para la elongación, acabando con un paso de 2' a 72°C. Para amplificar el gen *ccmF2* las condiciones de desnaturalización, anillamiento y elongación para los 30 ciclos fueron de 30" a 94°C, 30" a 60°C y 30" a 72°C.

3.2.4.3 GENES NUCLEARES

De las 8 zonas elegidas inicialmente como marcadores para realizar la filogenia del genero *Androcymbium* (Colchicaceae), finalmente sólo se pudo optimizar las condiciones de amplificación para cuatro de ellas, correspondientes a los genes *RNApol2*, *waxy*, *malato sintasa*, y *DFR*.

Para amplificar el intrón 23 del gen *RNApol2* se trabajó con un volumen de amplificación de 50 µl a 1x PCR buffer (Bioline), 4 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,2 mM de cada dNTP (Bioline), 0,3 µM de cada cebador (Eurogentec), 1 U de Taq-polimerasa Biotaq (Bioline) y 125 ng de DNA. Las condiciones de amplificación fueron de 3' a 94°C para activar la Taq-polimerasa, seguidas por 30 ciclos de 30" a 94°C para la desnaturalización del DNA, 20" a 62°C para la hibridación de los cebadores y 20" para la elongación, acabando con un paso de 3' a 72°C.

Para amplificar la zona del gen *waxy* entre los exones 8 y 13, se trabajó con un volumen de amplificación de 50 µl a 1x PCR buffer (Bioline), 4 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,1mM de cada dNTP (Bioline), 0,4 µM de cada cebador (Eurogentec), 1 U de Taq-polimerasa Biotaq (Bioline) y 100 ng de DNA. Las condiciones de hibridación fueron de 3' a 94°C para activar la Taq-polimerasa, seguidas por 35 ciclos de 30" a 94°C para la desnaturalización del DNA, 40" a 59°C para el anillamiento de los cebadores y 1' a 72°C para la elongación, acabando con un paso de 7' a 72°C.

Para amplificar la zona del gen *malato sintasa* entre los exones 1 y 3, se trabajó con un volumen de amplificación de 50 µl a 1x PCR buffer (Bioline), 4 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,25 mM de cada dNTP (Bioline), 0,6 µM de cada cebador (Eurogentec), 1 U de Taq-polimerasa Biotaq (Biotaq) y 50 ng de DNA. Las condiciones de amplificación fueron de 4' a 94°C para activar la Taq-polimerasa, seguidas por 35 ciclos de 1' a 94°C para la desnaturalización del DNA, 1' a 55°C para la hibridación de los cebadores y 2' a 72°C para la elongación, acabando con un paso de 7' a 72°C.

Para amplificar la zona del gen *DFR* entre los exones 1 y 4, se trabajó con un volumen de amplificación de 50 µl a 1x PCR buffer (Bioline), 4 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,1 mM de cada dNTP (Bioline), 0,4 µM de cada cebador (Eurogentec), 1U de Taq-polimerasa Biotaq (Bioline) y 125 ng de DNA. Las condiciones de amplificación fueron de 3' a 94°C para activar la Taq-polimerasa, seguidas por 30 ciclos de 30" a 94°C para la desnaturalización del DNA, 30" a 55°C para la hibridación de los cebadores y 1' a 72°C para la elongación, acabando con un paso de 2' a 72°C.

3.2.4.4 COMPROBACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS AMPLIFICACIONES

La comprobación de las diferentes amplificaciones se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y reveladas con bromuro de etidio. Para saber el peso molecular de la banda amplificada se utilizaron los marcadores moleculares λ *EcoRI* – *HindIII* (DNA molecular weight marker III – Roche) y 250 bp (DNA molecular weight marker XIV – Roche). Las amplificaciones de los diferentes individuos que resultaron ser positivas fueron purificadas en columnas GFX™ PCR DNA (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del proveedor. La purificación consiste en eliminar los cebadores y el exceso de nucleótidos trifosfato

(dNTP's) de las muestras previo a su secuenciación. Esta limpieza fue igualmente comprobada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

3.2.5 Secuenciación de DNA

La reacción de secuenciación, adaptada a la técnica de fluorocromos del secuenciador automático ABIPRISM 310 (Applied Biosystems), se fundamenta en el método de los didesoxinucleótidos como terminadores de la reacción propuesto por Sanger et al. (1977). Para cada reacción de secuenciación de los genes cloroplásticos, se utilizaron 50 ng del producto de PCR purificado, 3,2 pmol de cebador (forward o reverse) y 4 µl de dRhodamine Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), para un volumen final de 10 µl. Para cada reacción de secuenciación de los genes mitocondriales y nucleares se utilizaron 50 ng del producto de PCR purificado, 3,2 pmol de cebador (forward o reverse), 5X BigDye sequencing buffer (Applied Biosystems) y 2 µl de BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) para un volumen final de 10 µl.

La reacción de secuenciación consiste en un ciclo de 3' a 92°C seguido por 25 ciclos de 30" a 94°C, 30" a 50°C y 4' a 60°C. Los productos de la reacción de secuenciación fueron precipitados siguiendo el protocolo del etanol/EDTA/acetato de sodio según las instrucciones del proveedor (Applied Biosystems). Este precipitado fue resuspendido con TSR (Applied Biosystems) previo a la lectura de las muestras mediante una electroforesis capilar en un secuenciador automático ABIPRISM 310 del Área de Genética de la Universitat de Girona. Todas las secuencias obtenidas fueron comprobadas y editadas a mano con el programa SeqEdit v1.0.3 (Applied Biosystems).

Dado que el genoma nuclear de las especies analizadas en este estudio es diploide, es habitual que aparezcan individuos heterocigotos en los cuales, debido a corrimientos en la pauta de lectura de las secuencias causadas por inserciones o deleciones (indels), el material secuenciado no puede ser leído. Por ello, para poder analizar estas muestras es necesario clonaras en plásmidos para obtener los dos alelos por separado. A partir del DNA genómico se realizó una PCR utilizando cebadores específicos del gen a clonar y el producto final purificado se clonó en un

vector pGEM-T (Promega). La reacción de ligación y transformación se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor (Promega). Para realizar la reacción de ligación de nuestra muestra con el vector, se trabajó a un volumen final de 10 μ l, añadiendo tampón de ligación 10x (Promega), 50 ng de vector pGEM-T (Promega), 1 μ l de ligasa T4 DNA (Promega) y 20 ng de DNA (producto de la PCR purificado). La ligación se incubó a 4°C durante 16 h y se transformó en la cepa XL1_blue de *E. coli* mediante choque térmico. Las bacterias fueron sembradas en medio selectivo conteniendo LB y un antibiótico (ampicilina) para seleccionar el crecimiento de colonias que habían incorporado el plásmido, ya que el plásmido insertado en las bacterias posee un gen de resistencia a la ampicilina. Posteriormente, se realizó un rastreo de las colonias crecidas en la placa mediante PCR (utilizando dos cebadores del vector flanqueantes del inserto; SP6 y T7), para ver cuáles de las colonias resistentes habían incorporado el plásmido con nuestro gen insertado. Con las colonias positivas se realizó una extracción de plásmido conteniendo nuestro inserto mediante el kit *High Pure Plasmid Isolation kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor. La reacción de secuenciación se realizó en un equipo ABI PRISM 310 utilizando dideoxinucleótidos fluorescentes y uno de los cebadores utilizados en la PCR. Ambas cadenas de DNA fueron secuenciadas. Se utilizaron 5 μ L de DNA purificado a 100 ng/ μ L y 3,2 pmol de primer.

3.2.6 Caracterización de las secuencias

Las secuencias fueron interpretadas y editadas con el programa SeqEdit v.1.0.3 (Applied Biosystems), alineadas con el programa ClustalW v.1.4 (Thompson et al. 1994) y comprobadas visualmente con Bioedit v.5.0.9 (Hall 1999).

3.2.6.1 CODIFICACIÓN DE LOS INDELS

Debido a la presencia de inserciones y deleciones (indels) en las secuencias fue necesario insertar espacios para poder alinearlas. Estos indels no suceden de forma aleatoria en las diferentes zonas dentro del genoma, sino que parecen estar asociados a motivos específicos de la secuencia de DNA (Kelchner 2000). Estos motivos pueden ser: (i) regiones con repeticiones de mononucleótidos y microsatélites (Levinson & Gutman 1987); (ii) regiones donde se generen bucles

(*loops*) en la estructura secundaria (Kelchner 2000); (iii) regiones con horquillas (*hairpins*) en la estructura secundaria (Kelchner & Wendell 1996); (iv) regiones donde se favorezca la recombinación intramolecular (Kelchner 2000).

Los indels menores de 3 pares de bases (pb) fueron eliminados, ya que en análisis previos de regiones no codificantes de DNA se ha visto que la distribución de estas inserciones o deleciones es recurrente entre los diferentes linajes (homoplasia) (van Ham et al. 1994; Bayer & Starr 1998). Los indels mas grandes de 2 pb no son propensos a paralelismos y pueden ser una fuente importante de información filogenética, sobretodo en estudios a nivel interespecífico (Kelchner 2000; Hamilton et al. 2003; Ingvarsson et al. 2003). Todos estos indels >2 pb fueron codificados como caracteres binarios (Simmons & Ochoterena 2000) utilizando el programa GapCoder (Young & Healy 2003). Al no eliminar los indels de las secuencias, como se hace en muchos estudios filogenéticos, y codificarlos como caracteres binarios, estos pueden ser utilizados como caracteres filogenéticamente informativos en el momento de hacer los diferentes análisis filogenéticos (Baptiste & Philippe 2002; Bhatramakki et al. 2002; Kawakita et al. 2003).

3.2.6.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS SECUENCIAS

Previo a la secuenciación de todas las especies con las que se cuenta, se secuenciaron entre 2 y 4 taxa para todas las regiones genómicas con tal de comprobar el nivel de variación existente en cada una de ellas. Para su elección se tuvo en cuenta su tamaño, el número de sitios variables, el número de indels, el valor PIC's (potentially informative characters: (NS+ID+IV), donde NS = nº de sustituciones nucleotídicas, ID = nº de indels, IV = nº de inversiones), y la proporción de eventos mutacionales calculado a partir de una versión modificada de la formula de O'Donnell (1992) y Gielly & Taberlet (1994) $[(n^{\circ} \text{ PIC's/L}) \times 100]$, donde L es la longitud del fragmento alineado.

3.2.7 Análisis filogenéticos

3.2.7.1 FILOGENIA MEDIANTE MÁXIMA PARSIMONIA

Los análisis de máxima parsimonia se basan en la resolución topológica de un árbol filogenético con el menor número de pasos evolutivos posibles. Los datos de

las secuencias de las diferentes regiones secuenciadas fueron analizados de forma conjunta y por separado para cada genoma estudiado.

Estos análisis se realizaron con la estrategia de búsqueda heurística (*heuristic search*), sugerida cuando el número de secuencias a analizar es superior a 20 (Nei & Kumar 2000). Se utilizó el algoritmo de adición paso a paso (*Stepwise addition*) para realizar la reconstrucción y obtener un árbol inicial con la adición de taxa de forma aleatoria (*random addition sequence*). Este algoritmo crea un árbol inicial con tres taxa a partir de tres secuencias elegidas al azar. Seguidamente se añade otra secuencia creándose tres posibles árboles con cuatro secuencias. El árbol que presenta una longitud menor es elegido para la siguiente adición. De esta manera se van añadiendo el resto de secuencias una a una de forma aleatoria, se calcula la longitud del árbol resultante y se va eligiendo siempre para el paso siguiente el de menor longitud. Al final se obtiene un árbol de máxima parsimonia provisional, ya que el método de *Stepwise addition* raramente crea un árbol con una topología global óptima y podrían existir otras soluciones con el mismo o inferior número de pasos. Por ello se necesitan otros métodos para perfeccionar la solución final y obtener el árbol mas parsimonioso. Uno de estos métodos es el de permutación de ramas (*branch-swapping*). Con este método se corta el árbol inicial en una o mas piezas generando sub-árboles con aproximadamente el mismo número de secuencias. Estos sub-árboles son posteriormente reconectados por diferentes ramas en búsqueda de árboles con la misma o inferior longitud. Existen tres algoritmos de *branch-swapping*, de los cuales elegimos el TBR (*Tree Bisection-Reconnection*) (Swofford & Begle 1993), ya que es el que permite analizar mayor número de árboles reconectados (Nei & Kumar 2000). Este algoritmo divide el árbol inicial en dos sub-árboles que se reconectan posteriormente por cualquier combinación entre dos ramas, una de cada sub-árbol. Todos los nuevos árboles así generados con longitudes iguales o inferiores a la solución inicial se consideran como una solución de máxima parsimonia. Además, mediante la adición al azar de 100 secuencias o *Random-addition sequence*, se identificaron múltiples islas de árboles igualmente parsimoniosos. Cada isla representa todos los árboles que pueden ser obtenidos a partir de cada una de las reorganizaciones, empezando por cualquier árbol de la isla, manteniendo y

reorganizando todos los árboles óptimos que son descubiertos. Si existen dos árboles óptimos de manera tal que es imposible lograr un solo árbol a partir de un algoritmo de reorganización, estos árboles se encuentran en diferentes islas. Es importante detectar cuando existen múltiples islas porque árboles de diferentes islas tienden a ser topológicamente diferentes, aunque presenten la misma longitud.

Para comprobar la robustez de cada nodo obtenido en el árbol filogenético se hizo un análisis de bootstrap (BS = bootstrap) (Felsenstein 1985). El análisis de bootstrap consiste en un remuestreo aleatorio y con reemplazamiento de los datos de la matriz original. De esta manera, a partir de la matriz inicial de n taxa con una longitud de m nucleótidos, se cogen aleatoriamente y con reemplazamiento, columnas de un nucleótido para los n taxa hasta formar una nueva matriz $n \times m$ de igual longitud que la inicial. A partir de la nueva matriz, se buscan todas las soluciones posibles igualmente parsimoniosas y se crea un árbol consenso de cada análisis. Este proceso se va repitiendo tantas veces como análisis bootstrap se quieran hacer. Con todos los árboles creados en cada uno de los análisis bootstrap, se construye un árbol consenso (*bootstrap strict consensus tree*). Para cada nodo del árbol generado, se indica su robustez mediante el porcentaje de árboles analizados en que aparece esa misma agrupación de las secuencias en los árboles utilizados para el consenso final.

Se realizaron 1000 análisis bootstrap, limitando a 5000 el número de árboles en cada análisis para acortar el tiempo de cálculo, con el programa PAUP* v.4.0b10 (Swofford 2003). Del árbol obtenido se calculó su longitud así como el índice de consistencia (CI) y el índice de retención (RI) para estimar los niveles de homoplasia en los caracteres.

3.2.7.2 FILOGENIA MEDIANTE INFERENCIA BAYESIANA

La inferencia Bayesiana fue usada en los inicios de la taxonomía numérica (Edwards 1970), aunque la completa aplicación de esta metodología a estudios filogenéticos fue descrita por Li (1996), Rannala & Yang (1996) y Mau y colaboradores (Mau 1996; Mau & Newton 1997; Mau et al. 1999).

La inferencia bayesiana, al igual que la máxima verosimilitud, es un método basado en probabilidades condicionales. Estos dos métodos se diferencian en que los

métodos filogenéticos de máxima verosimilitud están basados en la probabilidad de los datos, las secuencias de DNA alineadas en nuestro caso, en función de la topología del árbol filogenético, la longitud de sus ramas y los parámetros evolutivos del modelo de sustitución nucleotídica elegido a priori, mientras que la inferencia Bayesiana se basa en la probabilidad a posteriori del árbol filogenético y los parámetros del modelo evolutivo en función de los datos. Para realizar una filogenia con métodos basados en inferencia Bayesiana, no es necesario estimar previamente los parámetros del modelo evolutivo de sustitución nucleotídica, aunque si que es necesario definir a priori el modelo a utilizar. La elección del modelo evolutivo de sustitución nucleotídica se realizó con el *Likelihood ratio test* (LRT) utilizando el programa Modeltest (Posada & Crandall 1998). A partir de un árbol filogenético obtenido previamente, ya sea utilizando métodos de máxima parsimonia o de distancias, el programa busca los parámetros de cada uno de los modelos evolutivos de forma que se maximice la función de probabilidad. Se empieza siempre utilizando el modelo mas simple, el que contiene menos parámetros, y calcula el valor de la probabilidad resultante (hipótesis nula). Posteriormente se buscan los parámetros que maximicen la función de probabilidad de otro modelo evolutivo mas complejo, con algún parámetro mas, y calcula el valor de la probabilidad (hipótesis alternativa). El LRT compara las dos probabilidades obtenidas y comprueba si son significativamente diferentes mediante una prueba de χ^2 . Cuando el valor de LRT es significativo, la conclusión es que la inclusión de parámetros adicionales en el modelo alternativo incrementa la probabilidad de los datos (las secuencias de DNA en nuestro caso). Consecuentemente, el uso del modelo mas complejo es favorecido. Se van comparando modelos evolutivos mas simples con modelos evolutivos que contiene mas parámetros, mas complejos, hasta que el valor del LRT es no significativo. El modelo con menos parámetros que da un valor de LRT no significativo es el elegido. El programa nos proporciona el modelo de sustitución nucleotídica que mas maximiza los valores de probabilidad de nuestro datos, así como los valores de todos los parámetros del modelo seleccionado.

Dado que con inferencia Bayesiana resulta prácticamente imposible alcanzar una única solución final, para evaluar la probabilidad a posteriori de la filogenia que

mejor se ajusta a los datos, se hacen aproximaciones utilizando simulaciones mediante el método de *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) (Hastings 1970). Mediante el algoritmo de Metropolis-Hastings-Green (MHG) (Metropolis et al. 1953; Hastings 1970; Green 1995), se construye una cadena de Markov que estima conjuntamente la probabilidad a posteriori de los parámetros del modelo evolutivo y del árbol filogenético en función de los datos. A continuación se estima una nueva topología de árbol y diferentes parámetros evolutivos de la que también se estima su probabilidad en función de los datos. Se comparan las probabilidades a posteriori de ambas simulaciones y se aceptan los parámetros y la topología del árbol con un valor mas alto de probabilidad. Este proceso es repetido miles de veces hasta que los valores de la probabilidad a posteriori se estabilizan. Los árboles obtenidos previamente a la estabilización son eliminados del análisis (*burn in*). Los árboles generados a partir de este punto son muestreados y almacenados a intervalos regulares (*thin*). Utilizando todos estos últimos árboles muestreados se genera un árbol consenso. En los nodos de cada árbol, aparece un valor que indica el porcentaje de árboles donde aparecen agrupados los diferentes taxa. Este valor es la probabilidad a posteriori del nodo (PP) y viene a ser un término equivalente al valor de confianza de bootstrap (Felsenstein 1985).

Para este estudio, hemos utilizado una variante de MCMC llamada Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MCMCMC) (Geyer 1991). Esta variante permite analizar en paralelo diferentes cadenas de Markov utilizando el algoritmo MHG, hecho que facilita el intercambio de parámetros entre cadenas durante el análisis. De esta forma tenemos diferentes cadenas, siendo la cadena muestreada la que presenta un mayor valor de probabilidad, llamada cadena fría (*cold chain*). El resto de cadenas de Markov se denominan cadenas calientes (*hot chain*). El hecho que se puedan intercambiar parámetros entre las diferentes cadenas durante el análisis, facilita la posibilidad de que la cadena fría, y por tanto la cadena muestreada, no sea siempre la misma. Este análisis permite ampliar el campo de análisis probabilístico, posibilitando el intercambio de parámetros entre los picos de probabilidad de las diferentes cadenas analizadas y saltando valles probabilísticos que el algoritmo de MCMC no haría por si solo.

Finalmente, una característica muy importante de este método, es que permite integrar en el análisis datos de diferentes fuentes. Así, podemos incluir en una misma matriz secuencias obtenidas de diferentes genomas, que se pueden analizar conjuntamente aunque tengan tasas evolutivas diferentes. También se puede agrupar en una misma matriz datos morfológicos y de enzimas de restricción, aunque para analizarlos conjuntamente hay que definir previamente cada uno de los conjuntos de datos, de forma que en las simulaciones se les pueda asignar modelos evolutivos independientes. De esta manera, en nuestro análisis pudimos incluir secuencias de diferentes genomas. Además, se pudieron incorporar los indels codificados como caracteres binarios 0/1 (presencia/ausencia).

Así, nuestros datos fueron analizados mediante dos aproximaciones diferentes; en la primera, se combinaron todos los datos procedentes de secuencias de DNA y los indels codificados como caracteres binarios. Para analizar los datos procedentes de las secuencias de DNA se utilizó el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica sugerido por el LRT (*likelihood ratio test*) Los indels, codificados como caracteres binarios, fueron tratados como datos tipo enzimas de restricción y solo teniendo en cuenta su presencia — ausencia. Para analizar estos indels con inferencia Bayesiana, el modelo evolutivo sugerido es el F81 (Felsenstein 1981), el cual solo contempla que la proporción de 0 y 1 no son iguales (Ronquist et al. 2005). En la segunda aproximación cada uno de los diferentes conjuntos de datos de las secuencias se analizó por separado. El punto de partida es que cada conjunto de datos presenta tasas evolutivas diferentes y, por tanto, valores de los parámetros del modelo evolutivo diferentes. Nuevamente, para elegir el modelo evolutivo que se ajusta mejor a cada conjunto de datos se utilizó el LTR (*Likelihood Ratio Test*).

En ambas aproximaciones se analizaron cuatro cadenas de Markov resueltas a lo largo de 1.500.000 generaciones ($n_{gen}=1.500.000$), empezando con árboles aleatorios y muestreando árboles cada 100 generaciones ($thin=100$) con el programa MrBayes v.3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). De esta manera se obtuvieron 15.000 árboles, aunque se descartaron los 3.000 árboles previos a la estabilización de los parámetros del modelo evolutivo ($burnin=3.000$), el 20% de árboles totales generados, porcentaje recomendado en Ronquist et al. (2005). Con los 12.000 árboles restantes se

realizo un árbol consenso con la regla del 50% (*50% majority-rule consensus tree*), donde se agrupan todos los taxa que aparecen juntos con una probabilidad a posteriori (PP) igual o superior al 50% en los árboles analizados.

Ya que la inferencia Bayesiana permite introducir parámetros evolutivos a priori y estos pueden ser calculados utilizando el LRT con Modeltest, se comprobó si la topología del árbol filogenético variaba al fijar a priori el valor de estos parámetros. Se realizaron dos tipos de análisis. El primer análisis se realizó analizando todos los datos de las diferentes secuencias de DNA de forma conjunta, sin particiones entre secuencias, y eligiendo como modelo evolutivo de sustitución nucleotídica y los valores de sus parámetros, aquellos obtenidos con el LRT para los datos de las diferentes secuencias analizados de forma conjunta. Para el segundo análisis se tuvo en cuenta que cada conjunto de datos podría ajustarse mejor a un modelo evolutivo diferente y con valores propios para cada parámetro. Se buscó con el LRT el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica que mejor se ajusta para cada región de DNA secuenciada y se calcularon los valores de sus parámetros. Tanto en el primer como en el segundo análisis, los indels codificados como caracteres binarios, fueron tratados como datos tipo enzimas de restricción y analizados utilizando el modelo evolutivo F81.

Para estos dos análisis se realizaron 1.000.000 generaciones (ya que definiendo a priori los valores de los parámetros del modelo evolutivo se estabiliza mas rápido la probabilidad de las cadenas de Markov) con cuatro cadenas de Markov y muestreando cada 100 generaciones (*thin=100*), obteniéndose de esta manera 10.000 árboles. Se eliminaron del análisis los 20.00 árboles previos a la estabilización de las cadenas de Markov (*burnin=2.000*), el 20%. Con los 8.000 árboles restantes se realizó un árbol consenso utilizando la regla del 50% (*50% majority-rule consensus tree*).

3.2.7.3 COMBINABILIDAD DE LOS DATOS

En nuestro estudio disponemos de secuencias de DNA de diferentes genomas para realizar la filogenia del género *Androcymbium* que podrían tener historias evolutivas diferentes. Por ello, se debe comprobar si estos fragmentos de los diferentes genomas analizados explican una misma historia evolutiva, es decir, si son

congruentes filogenéticamente y por tanto si pueden ser combinados para realizar una filogenia. Muchos autores consideran que datos de diferentes regiones del DNA solo se pueden combinar si no son fuertemente incongruentes unos con otros (Sytsma 1990; Bull et al. 1993; Huelsenbeck et al. 1996; Baum et al. 1998; Johnson & Soltis 1998; Thornton & DeSalle 2000; Yoder et al. 2001; Barker & Lutzoni 2002; Buckley et al. 2002). Los autores que siguen el criterio de combinación condicional (*conditional combination*) descrito por Bull et al. (1993), en el cual el análisis de diferentes conjuntos de datos es realizado por separado si son incongruentes evolutivamente y conjuntamente si son congruentes, evalúan la significación de la incongruencia utilizando el test ILD (*Incongruence Length Difference*) (Farris et al. 1995), ya que se considera un buen punto de partida para comparar particiones de datos (Mason-Gamer & Kellogg 1996). Este test también es comúnmente utilizado como indicador de congruencia topológica, de homogeneidad evolutiva y como criterio a la hora de combinar diferentes conjuntos de datos para realizar una filogenia (Barker & Lutzoni 2002). El test ILD se encuentra integrado en PAUP* como *partition homogeneity test* y esta basado en métodos de máxima parsimonia. El principio de este test es que, si existe incongruencia filogenética entre los diferentes conjuntos de datos, la longitud de los árboles será menor cuando mantengamos los caracteres en las particiones originales que cuando estén repartidos de forma aleatoria. El programa inicialmente determina las longitudes de los árboles mas cortos para cada conjunto de datos por separado y luego produce una suma de sus longitudes. Posteriormente, los datos de los diferentes conjuntos son combinados y se hacen particiones al azar en conjuntos de datos de la misma longitud que el original. La suma de las longitudes de los árboles de los conjuntos de datos originales es comparada con la de aquellos obtenidos a partir de los conjuntos de datos repartidos de forma aleatoria. Se parte de la hipótesis nula que los conjuntos de datos explican la misma historia evolutiva. Existe incongruencia evolutiva, y por tanto se rechaza la hipótesis nula, cuando encontramos una probabilidad baja ($p \leq 0,05$) de que la suma de las longitudes de los árboles iniciales esté dentro de la distribución de longitudes de los árboles generados con los datos repartidos de

forma aleatoria. De esta manera interpretaremos que la evolución de cada uno de los conjuntos de datos es diferente.

En estudios recientes se ha demostrado que el test ILD suele fallar a la hora de comprobar la combinabilidad de los diferentes conjuntos de datos y la congruencia filogenética, ya que este test es muy propenso a cometer errores de tipo I (rechazar la hipótesis nula cuando esta es cierta). Conjuntos de datos que comparten una misma historia evolutiva pueden exhibir niveles de incongruencia significativa al realizar el test ILD. El test parece, sin embargo, ser menos susceptible a cometer errores de tipo II (aceptar la hipótesis nula cuando esta no es cierta) (Dolphin et al. 2000; Barker & Lutzoni 2002; Darlu & Lecointre 2002). Debido a que no es conveniente tomar la decisión de combinar o no combinar diferentes conjuntos de datos basándonos en un solo test (Hipp et al. 2004) y habiéndose demostrado que este puede fallar, se decidió verificar los resultados mediante métodos. Por ejemplo Wiens (1998) recomienda analizar los conjuntos de datos por separado y evaluar la robustez de los clados en cada uno de ellos. Posteriormente se analizan los datos conjuntamente para obtener otro árbol. Este árbol es la mejor estima de la filogenia, pero se consideran cuestionables aquellas partes del árbol que han sido conflictivas cuando se analizaron los datos por separado. Estas partes conflictivas se consideran inciertas a no ser que la mayoría de conjuntos de datos favorezcan una resolución del conflicto sobre la otra.

3.2.7.4 COMPARACIÓN ENTRE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS: TEST SHIMODAIRA-HASEGAWA

Para comparar la topología de los árboles filogenéticos obtenidos a partir de los datos de las diferentes regiones secuenciadas y utilizando diferentes metodologías de análisis (máxima parsimonia e inferencia Bayesiana) se utilizó el test de Shimodaira-Hasegawa (Shimodaira & Hasegawa 1999) con el programa PAUP* v.4.0b10. Se calcula la probabilidad de cada árbol filogenético obtenido a partir de cada una de las regiones secuenciadas bajo el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica obtenido mediante el LRT con el programa Modeltest. Se elige la probabilidad del mejor árbol en función de los datos (secuencias de DNA) y se comprueba si el valor de probabilidad de los otros árboles es significativamente

diferente o no. La hipótesis nula es que no hay diferencias significativas entre las topologías de los árboles, mientras que la alternativa es que hay diferencias significativas entre las topologías de los árboles analizados. El test nos calcula el valor de probabilidad de cada árbol en función de los datos, teniendo en cuenta el modelo evolutivo y el valor de sus parámetros seleccionados a priori, y nos da un valor de p para cada topología comparada, indicándonos cuales son significativamente diferentes de la que presenta un valor mas alto de probabilidad y cuales no.

3.2.8 Análisis biogeográfico

Se realizaron dos tipos de análisis biogeográficos: uno utilizando métodos basados en patrones biogeográficos (*pattern-based methods*) y otro utilizando métodos basados en eventos biogeográficos (*event-based methods*). El método basado en patrones biogeográficos elegido fue el análisis de ancestralidad de áreas descrito por Bremer (1992) y se utiliza para asignar la posible área de origen de los taxa a analizar, en nuestro caso el origen geográfico del género *Androcymbium*, y las direcciones de colonización en modelos de dispersión. Este método se basa en medir el ajuste del árbol filogenético a un escenario biogeográfico en particular. A partir del árbol de máxima parsimonia y del obtenido con estadística Bayesiana, se realizó un análisis de ancestralidad de áreas para encontrar la región geográfica más probable de origen del género. Este método cladista trata cada una de las áreas donde aparece cada haplotipo como un carácter, el cual puede ser optimizado sobre el cladograma o el árbol filogenético resultante utilizando forward o reverse parsimonia de Camin & Sokal (1965), donde solo se permite un solo tipo de cambio de estado ($0 \rightarrow 1$ en forward parsimonia y $1 \rightarrow 0$ en reverse parsimonia) y las reversiones de estado no son posibles. Se asignan todas las áreas de distribución geográfica de las especies desde cada uno de los nodos internos del árbol, hasta cada una de las ramas terminales. Comparando el número de ganancias y pérdidas de áreas bajo las dos optimizaciones (forward y reverse), es posible estimar cual de las áreas fue probablemente la mas ancestral. La región ancestral más probable es aquella que presenta un valor más alto en la relación ganancia/pérdida de áreas.

El método basado en eventos biogeográficos utilizado fue el descrito por Ronquist (1997). Utilizando este método, se crea una biogeografía de áreas a partir del árbol filogenético y de una matriz de distribución, donde se especifican las áreas en que habita cada taxa. Este método asume que las distribuciones de las especies y de sus ancestros pueden ser descritas en términos de conjuntos de unidades de áreas. La reconstrucción óptima de las distribuciones ancestrales (los nodos del árbol filogenético) se obtiene a partir de la optimización de una matriz tridimensional de costes siguiendo las siguientes reglas: (i) la especiación por separación vicariante de una gran distribución en dos subconjuntos de áreas tiene un coste cero; (ii) la especiación en una misma área por especiación alopátrida o simpátrida que genera dos descendientes en esa misma área tiene un coste cero; (iii) la dispersión de una especie hacia un área nueva tiene un coste de una unidad por área de distribución; (iv) la extinción de un área tiene el coste de una unidad por área de distribución. Siguiendo estas reglas y a partir de un árbol filogenético dicotómico y la matriz de distribuciones, se obtiene una biogeografía de áreas utilizando el programa DIVA (Ronquist 1996).

3.2.9 Reloj Molecular

La hipótesis del reloj molecular es una metodología que desde que fue descrita a mediados de los 60 por Zuckerkandl & Pauling (1965) se ha utilizado para datar multitud de procesos evolutivos utilizando los árboles filogenéticos. Esta hipótesis parte de la suposición que los genes evolucionan siguiendo tasas constantes a través del tiempo y entre los diferentes linajes. De esta manera, se pueden desarrollar escalas de tiempo para datar eventos evolutivos a partir de un punto de datación conocido (p.e. registro fósil o eventos geológicos). Aunque en esta metodología se debe asumir que la tasa evolutiva es homogénea entre genes, regiones genómicas, taxa y linajes, en algunas ocasiones estas asunciones son violadas, pero no por ello el reloj molecular ha dejado de ser una herramienta muy habitual para datar eventos en biología evolutiva.

Actualmente se puede comprobar si los datos se ajustan a la hipótesis del reloj molecular, y por tanto, si las tasas evolutivas son constantes entre las diferentes

regiones amplificadas y a través de los diferentes taxa mediante el LRT (*likelihood ratio test*). Por ejemplo, en nuestro caso calculamos con el programa PAUP* (Swofford 2003) la probabilidad de los datos según el modelo evolutivo y parámetros seleccionados, forzando (L_0) y sin forzar (L_1) la hipótesis del reloj molecular (Huelsenbeck & Rannala 1997). Los dos valores de probabilidad obtenidos se comparan con el LRT mediante una prueba χ^2 utilizando el programa Modeltest (Posada & Crandall 1998). Si las dos probabilidades no son significativamente diferentes, entonces se supone que los datos de las secuencias han evolucionado de acuerdo con la hipótesis del reloj molecular.

El método elegido para obtener el cronograma del género *Androcymbium*, fue uno basado en estadística bayesiana. Este método no asume estrictamente la hipótesis del reloj molecular y permite el uso simultáneo de diferentes parámetros evolutivos para cada conjunto de datos (Thorne et al. 1998; Thorne & Kishino 2002). Además, permite la utilización de diferentes puntos de calibración en el árbol filogenético creando así lo que se conoce como *local clock* (relojes locales) (Yoder & Yang 2000) para cada punto de calibración. Para datar cada uno de los nodos del árbol filogenético utilizando métodos basados en la estadística Bayesiana, se utilizaron los programas PALM (Yang 1997) y Multidivtime (Thorne et al. 1998; Kishino et al. 2001). Este método de datación basado en la estadística Bayesiana, utiliza modelos probabilísticos para describir los cambios en la tasa evolutiva a través del tiempo, utilizando el procedimiento de Markov chain Monte Carlo (MCMC) para calcular a posteriori la distribución de las tasas evolutivas y los tiempos de divergencia de cada nodo del árbol.

Para nuestro análisis, inicialmente solo contábamos con dos puntos de calibración conocidos gracias al trabajo realizado por Vinnersten & Bremer (2001) donde se datan las relaciones filogenéticas entre especies correspondientes a siete familias del orden de las Liliales utilizando los métodos *mean branch-length* (Bremer & Gustafsson 1997) y *non-parametric rate smoothing* (Sanderson 1997). Estos dos puntos de calibración son la separación entre las familias Alstroemeriaceae - Colchicaceae (58 ± 7 ma = millones de años) y la divergencia entre los géneros *Androcymbium*, *Colchicum* y *Gloriosa* (16 ± 6 ma). Dado que estos dos puntos de

calibración no son suficientes para poder realizar una correcta datación de los procesos evolutivos en el género *Androcymbium*, ya que pertenecen únicamente a especies analizadas como *outgroup* en nuestro análisis y no contamos con ningún nodo de calibración interno para nuestras especies, se decidió realizar un paso mas y utilizar una nueva estrategia con tal de obtener dataciones internas para alguno de los nodos de nuestro árbol filogenético. Este paso consistió en realizar una filogenia con métodos de inferencia Bayesiana, a partir de las secuencias de DNA de la familia Colchicaceae que utilizaron para hacer la filogenia de esta familia Vinnersten & Reeves (2003) y que se encuentran depositadas en el GenBank. Las condiciones de análisis con inferencia Bayesiana son las mismas que las descritas anteriormente para los datos de nuestras secuencias ($n_{gen}=1.500.000$; $thin=100$; $burnin=3.000$). El árbol obtenido y los datos de las secuencias de DNA obtenidas del GenBank, se utilizaron para datar los nodos del árbol de la familia Colchicaceae utilizando los programas PAML y Multidivtime. Para hacer el análisis se pudieron utilizar cuatro puntos de calibración obtenidos del trabajo de Vinnerstern & Bremer (2001). Estos cuatro puntos son: (i) el nodo que agrupa a la tribu Colchiceae y a cinco géneros de la tribu Iphigenieae (16 ± 6 ma); (ii) el nodo que separa el género *Disporum* del género *Uvularia* (22 ± 7 ma); (iii) el nodo que agrupa a todos los géneros de la familia Colchicaceae a excepción de *Burchardia*, *Disporum* y *Uvularia* (23 ± 7 ma); (iv) el nodo que agrupa a todos los géneros que forman la familia Colchicaceae (34 ± 8 ma). Con este análisis se pretendía datar los nodos internos del árbol de la familia Colchicaceae que pudieran servir a su vez como puntos de calibración para el árbol filogenético de *Androcymbium*.

El primer paso para realizar una datación con esta metodología basada en inferencia Bayesiana es estimar los parámetros evolutivos del modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustan a los datos de las secuencias de DNA utilizando el módulo "baseml" del programa PAML (Yang 1997), ya que el *output file* de este módulo es el *input file* del siguiente módulo de análisis del programa Multidivtime . A partir de los datos de las secuencias de DNA y de uno de los árboles filogenéticos dicotómicos obtenidos con métodos de inferencia Bayesiana, se calculan los parámetros según el modelo evolutivo F84+ Γ (Felsenstein 1984; diferentes

frecuencias nucleotídicas, diferencia ts/tv, heterogeneidad evolutiva entre sitios) tal y como se recomienda en el manual de Thorne (Rutschmann 2004) para realizar dataciones moleculares utilizando inferencia Bayesiana con los programas PAML y Multidivtime. El siguiente paso consiste en calcular las longitudes de las ramas del árbol enraizado y la longitud media de las longitudes de las ramas desde la base del *ingroup* hasta el extremo de cada una de las secuencias analizadas (que es una estimación de la tasa evolutiva del *ingroup*), para lo cual se utilizó el módulo “estbranches” del programa Multidivtime a partir de los resultados obtenidos con el módulo “baseml” del programa PAML. A partir de las estimaciones de las longitudes de las ramas del árbol filogenético y de la tasa evolutiva del *ingroup*, el programa Multidivtime aproxima, utilizando estadística Bayesiana y el procedimiento de MCMC, la distribución a posteriori de las tasas evolutivas de los nodos y de cada una de las ramas, y los tiempos de divergencia entre los taxa (Thorne et al. 1998; Kishino et al. 2001; Thorne & Kishino 2002).

Los datos cronológicos obtenidos en este análisis a partir de los datos de las secuencias de la familia Colchicaceae servirán para datar, y por tanto serán utilizados como puntos de calibración, diversos nodos internos del árbol filogenético de *Androcymbium* obtenido con inferencia Bayesiana. Con los datos de las secuencias de DNA de nuestro estudio, el árbol filogenético dicotómico obtenido con inferencia Bayesiana y con los puntos de calibración obtenidos en el anterior análisis, se realizó una datación de los diferentes procesos evolutivos del género *Androcymbium* utilizando aproximaciones basadas en estadística Bayesiana con los programas PAML/Multidivtime.

Los parámetros para hacer los análisis, tanto utilizando los datos de las secuencias de DNA obtenidas del GenBank de la familia Colchicaceae como con los datos de nuestras propias secuencias, fueron 3.000.000 repeticiones de la cadena de Markov eliminadas previo a la primera cadena muestreada (*burnin* = 3.000.000) y 100.000 repeticiones realizadas de la cadena de Markov después del *burnin*, muestreando una cadena cada 100 repeticiones (*thin* = 100). El resto de parámetros necesarios para el cálculo de la datación de cada uno de los nodos del árbol fueron los determinados por el autor.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Extracción de DNA

Se consiguió extraer DNA de forma exitosa de todos los individuos de las 29 especies del género *Androcymbium* (Colchicaceae) y de las nueve especies seleccionadas como outgroups para enraizar el árbol filogenético. Se obtuvieron concentraciones de DNA entre 800 ng/μl y 50 ng/μl. Las muestras con concentración inferior a 50 ng/μl fueron descartadas. La ratio seleccionada varió entre 2,1 y 1,8. Las muestras con valores inferiores a 1,8 fueron también descartadas. Se eligieron las muestras con concentración de proteína igual o inferior a 0,4 mg/ml. Todas la muestras fueron diluidas con tampón T.E. hasta obtener una concentración final de 25 ng/μl de DNA.

3.3.2 Amplificaciones

Las regiones del DNA cloroplástico que si pudieron ser amplificadas de forma exitosas fueron: (i) el intrón del gen *trnL* (*trnL* intrón), (ii) la región no codificante entre los genes *trnL* y *trnF* (*trnL-trnF* IGS: *intergenic spacer*), (iii) la región no codificante entre los genes *trnY* y *trnD* (*trnY-trnD* IGS), (iv) la región no codificante entre los genes *trnH* y *psbA* (*trnH-psbA* IGS) y (v) la región no codificante entre los genes *trnT* y *trnL* (*trnT-trnL* IGS) (Fig. 3.6).

Fig. 3.6: amplificaciones de las diferentes regiones de DNA cloroplástico.

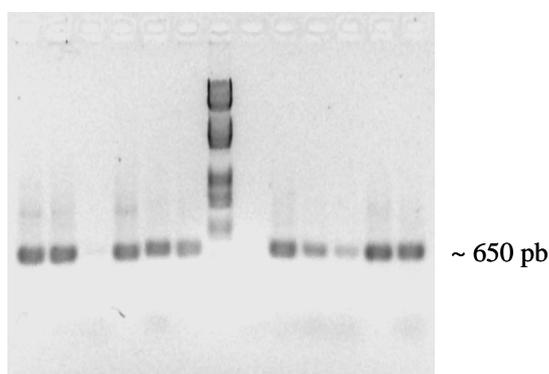


Fig. 3.6a: *trnL* intrón

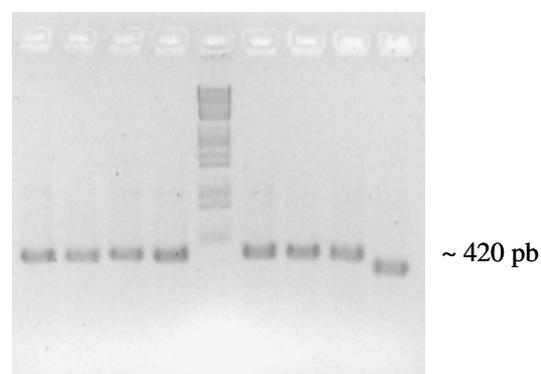
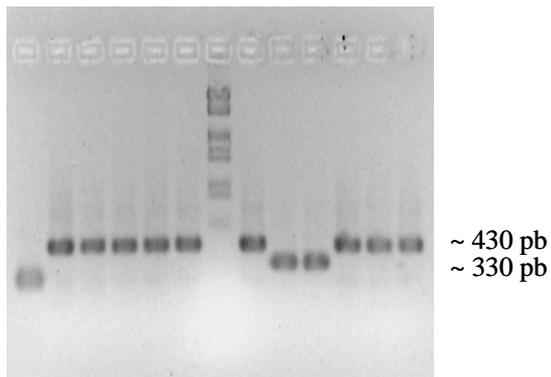
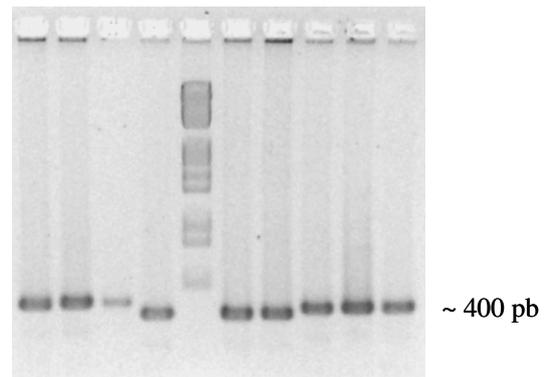
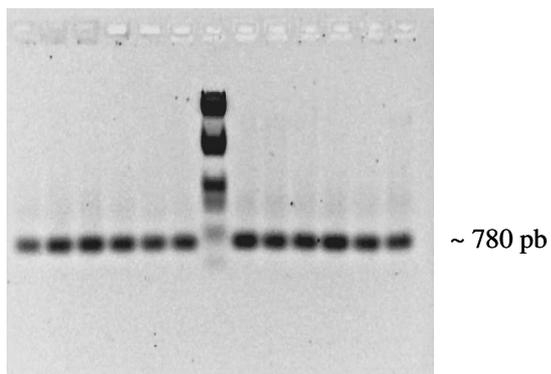


Fig. 3.6b: *trnL* – *trnF* IGS

Fig. 3.6: (cont.)

Fig. 3.6c: *trnY* – *trnD* IGSFig. 3.6d: *trnH* – *psbA* IGSFig. 3.6e: *trnT* – *trnL* IGS

Tanto del gen *matK* como de la región no codificante entre los genes *psaC* y *ndhE*, no se pudo conseguir una amplificación óptima y por tanto, no pudieron ser secuenciadas

Las tres regiones mitocondriales seleccionadas para realizar la filogenia (intrón 2 del gen *nad1*, gen *ccmF2* y gen *cox3*) se pudieron amplificar correctamente (Fig. 3.7).

De la ocho zonas del genoma nuclear elegidas como marcadores para realizar la filogenia, solo cuatro pudieron ser amplificadas correctamente (el intrón 23 del gen *RNApol2*, el gen *malato sintasa*, el gen *waxy* y el gen *DFR*) (Fig. 3.8).

Fig. 3.7: amplificación de las diferentes regiones de DNA mitocondrial.

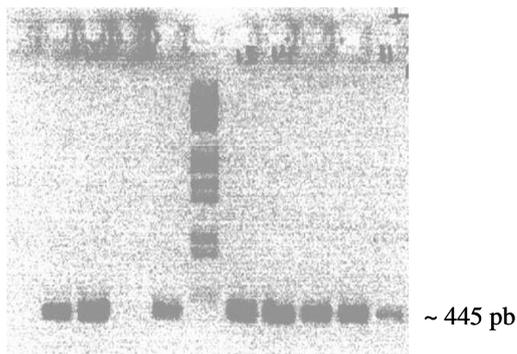


Fig. 3.7a: *ccmF2*

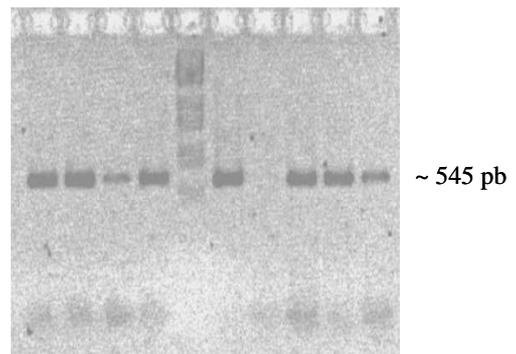


Fig. 3.7b: *cox3*

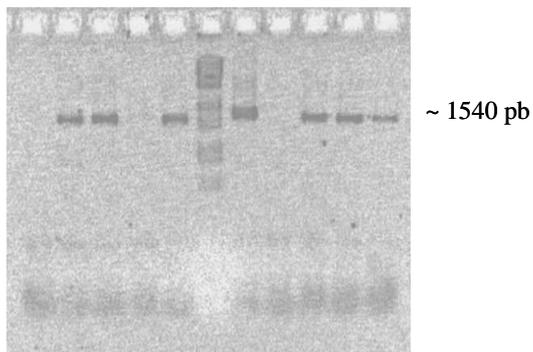


Fig. 3.7c: *nad1_intrón 2*

Fig. 3.8: amplificación de las diferentes regiones de DNA nuclear.

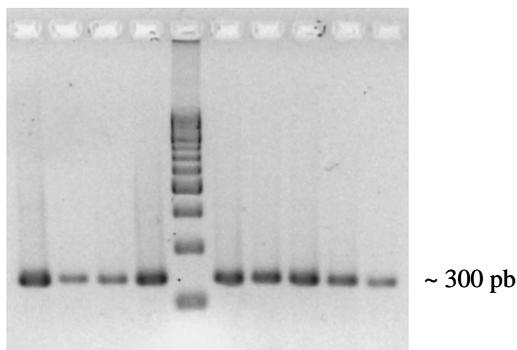


Fig. 3.8a: *RNAPol2_intrón 23*

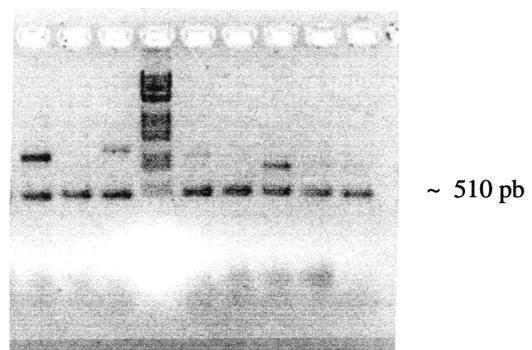


Fig. 3.8b: *malato sintasa*

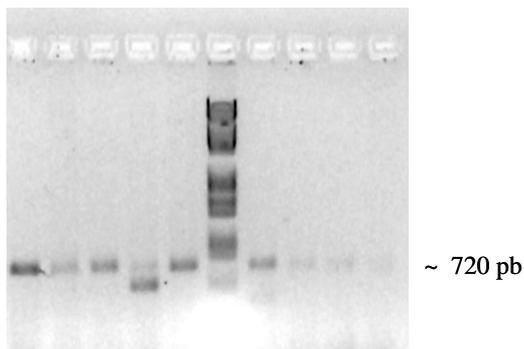


Fig. 3.8c: *waxy*

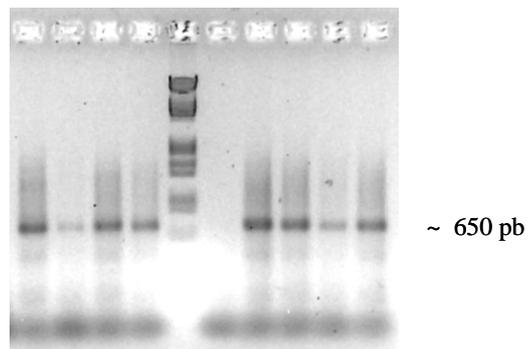


Fig. 3.8d: *DFR*

3.3.3 Secuenciación de DNA

Debido al gran tamaño del fragmento amplificado, para secuenciar por completo las regiones cloroplásticas *trnT-trnL* IGS y *trnL* intrón, así como para las tres regiones mitocondriales, fue necesario realizar dos reacciones de secuenciación, una utilizando el cebador *forward* y otra utilizando el cebador *reverse*. Para secuenciar por completo las regiones cloroplásticas *trnL-trnF* IGS, *trnY-trnD* IGS y *trnH-psbA*, solo se necesitó utilizar uno de los dos cebadores (*forward* o *reverse* indistintamente).

De los genes nucleares *waxy*, *malato sintasa*, y *DFR*, no se pudo obtener ninguna secuencia clara y por ello fueron descartados del análisis. Sin embargo, del intrón 23 de gen *RNApol2* si que se pudieron obtener secuencias claras en los individuos homocigotos y en algunos heterocigotos. Estas secuencias pudieron ser leídas correctamente, ya que entre las dos secuencias de esos heterocigotos solo habían cambios nucleotídicos que no provocaban corrimientos en la pauta de lectura de las secuencias, hecho que las haría imposible de interpretar. Sin embargo, en otros casos, las secuencias de estos individuos heterocigotos no se pudieron analizar debido a dobles señales y corrimientos de la pauta de lectura en el cromatograma de la secuenciación. Por ello, en algunos casos fue necesario clonar el gen amplificado en un plásmido previo a su secuenciación, para poder ser leído.

3.3.4 Caracterización de las secuencias

3.3.4.1 COMPROBACIÓN DE LOS NIVELES DE VARIACIÓN

Antes de secuenciar todos los individuos a analizar para una región del DNA, se realizó una prueba utilizando entre dos y cuatro individuos de diferentes especies para comprobar el tamaño y los niveles de variación de esa región y, por lo tanto, su nivel de utilidad filogenética (Tabla 3.3). De las cinco regiones amplificadas de DNA cloroplástico, la región *trnT - trnL* IGS fue la única descartada debido a su gran tamaño (requería dos reacciones de secuenciación para obtener la secuencia completa) y su escaso nivel de variación. Todas las zonas del genoma mitocondrial fueron descartadas ya que sus niveles de variación eran casi nulos. La única región del DNA nuclear que se consiguió secuenciar es la que presenta mas nivel de variación.

Tabla 3.3: análisis de los niveles de variación de las regiones de DNA secuenciadas previo a su secuenciación en todos los taxa a estudiar. pb: pares de bases.

	cpDNA					nDNA	mtDNA		
	<i>trnL</i> intrón	<i>trnL-trnF</i> IGS	<i>trnY-trnD</i> IGS	<i>trnH-psbA</i> IGS	<i>trnT-trnL</i> IGS	<i>RNAPol2_i23</i>	<i>nad1_i2</i>	<i>cox3</i>	<i>ccmF2</i>
Longitud alineada (pb)	655	442	327	466	792	309	1545	551	445
Sitios variables	22	11	7	11	5	16	6	0	2
Número de indels	8	5	3	6	1	2	3	0	0
PIC's	30	16	10	17	6	18	9	0	2
Porcentaje de variabilidad	4,6	3,6	3,1	3,6	0,8	5,8	0,6	0	0,4

3.3.4.2 GENES CLOROPLÁSTICOS

3.3.4.2.1 *trnL* intrón

En trabajos previos, se ha visto que la longitud del intrón del gen *trnL* varia desde los aproximadamente 250 pb en briofitos y pteridofitos (Stech et al. 2003) hasta por encima de los 1400 pb encontrados en algunas angiospermas (p.e. *Disa* [Orchidaceae], Bellstedt et al. 2001). En nuestro estudio hemos encontrado que el tamaño de esta región varia entre los 567 pares de bases (pb) encontrados como media en las especies utilizadas como outgroups, hasta los 613 pb que se obtuvieron como media en las especies del norte de África e Islas Canarias (Tabla 3.4). Para poder alinear todas las secuencias se insertaron 49 zonas con indels, obteniéndose una longitud total, una vez alineadas, de 774 pb (Tabla 3.5a). Para alinear únicamente las secuencias de las especies del género *Androcymbium*, se insertaron 27 zonas con indels, obteniéndose una longitud final de 754 pb (Tabla 3.5b). El porcentaje de variabilidad de esta región calculado a partir de una versión modificada de la formula usada en O'Donnell (1992) y en Gielly & Taberlet (1994) con todas las especies analizadas fue del 26,1%. La zona mas variable de esta región una vez alineada calculada a partir del número de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias alineadas (π : Nei 1987; Nei & Miller 1990) se encuentra entre los nucleótidos 450 y 500 (Fig. 3.9). Su composición nucleotídica media es de un 35,84% de adenina (A), 15,05% de citosina (C), 17,52% de guanina (G) y del 31,59% de timina (T) (Tabla 3.4).

Tabla 3.4: longitud media, desviación estándar (StDev.) y composición nucleotídica de las regiones amplificadas

		<i>trn L intrón</i>	<i>trn L-trn F IGS</i>	<i>trn Y-trn D IGS</i>	<i>trn H-psb A IGS</i>	cpDNA	<i>RNApol 2_i23</i>	Combinado
Norte de África		613 (9)	396 (2)	358 (34)	352 (9)	1706 (29)	308 (0)	2015 (29)
Sudáfrica oriental		596 (2)	399 (5)	329 (56)	349 (0)	1659 (59)	308 (1)	1969 (57)
Sudáfrica occidental		604 (14)	391(15)	316 (60)	341 (26)	1594 (64)	302 (5)	1899 (67)
<i>A. austrocapense</i>		598	397	368	349	1712	308	2020
<i>A. asteroides</i>		597	393	369	356	1715	308	2023
<i>A. roseum</i>		625	396	376	560	1957	308	2265
<i>A. melanthioides</i>		575	380	370	364	1689	308	1997
Grupos externos	Colchiceae	568 (4)	395 (5)	372 (13)	355 (2)	1677 (12)	306 (0)	1990 (13)
	TOTAL	567(17)	387 (24)	354 (40)	354 (17)	1650 (54)	306 (0)	1962 (56)
Composición Nucleotídica	A	35,84	32,81	32,05	31,64	33,43	28,15	32,75
	C	15,05	16,25	22,48	15,89	17,07	16,69	17,02
	G	17,52	15,49	15,33	20,31	17,22	21,75	17,80
	T	31,59	35,45	30,14	32,16	32,29	33,41	32,43

Tabla 3.5a: características de las secuencias alineadas.

	<i>trn L intrón</i>	<i>trn L-trn F IGS</i>	<i>trn Y-trn D IGS</i>	<i>trn H-psb A IGS</i>	<i>RNApol 2_i23</i>	cpDNA	Combinado
Longitud alineada (pb)	774	496	495	798	314	2563	2877
Sitios variables (%)	153 (19,7)	104 (21,0)	112 (22,6)	117 (14,6)	84 (26,8)	486 (18,9)	570 (19,8)
Sitios parsimoniosamente informativos (%)	57 (7,4)	42 (8,5)	31 (6,3)	44 (5,5)	48 (15,3)	174 (6,8)	222 (7,7)
Sitios autapomorficos (%)	96 (12,4)	62 (12,5)	81 (16,4)	73 (9,1)	36 (11,5)	312 (12,2)	348 (12,1)
Numero de indels (parsimoniosamente informativos)	49 (25)	23 (6)	33 (8)	46 (17)	10 (2)	151 (56)	161 (58)
Sitios parsimoniosamente informativos incluyendo indels informativos (%)	82 (10,6)	48 (9,7)	39 (7,9)	61 (7,6)	50 (15,9)	230 (9,0)	280 (9,7)
PIC's	202	127	145	163	94	637	731
Porcentaje de variabilidad	26,1	25,6	29,3	20,4	29,9	24,9	25,4

Tabla 3.5b: características de las secuencias alineadas para las especies del género *Androcymbium*.

	<i>trn L intrón</i>	<i>trn L-trn F IGS</i>	<i>trn Y-trn D IGS</i>	<i>trn H-psb A IGS</i>	<i>RNApol 2_i23</i>	cpDNA	Combinado
Longitud alineada (pb)	754	438	451	782	313	2425	2738
Sitios variables (%)	64 (8,5)	44 (10,0)	33 (7,3)	54 (6,9)	71 (22,7)	195 (8,0)	266 (9,7)
Sitios parsimoniosamente informativos (%)	39 (5,2)	24 (5,5)	13 (2,9)	28 (3,6)	37 (11,8)	104 (4,3)	141 (5,1)
Sitios autapomorficos (%)	25 (3,3)	20 (4,6)	20 (4,4)	26 (3,3)	34 (10,5)	91 (3,8)	125 (4,6)
Numero de indels (parsimoniosamente informativos)	27 (16)	5 (4)	9 (4)	34 (14)	6 (2)	75 (38)	81 (40)
Sitios parsimoniosamente informativos incluyendo indels informativos (%)	55 (7,3)	28 (6,4)	17 (3,8)	42 (5,4)	73 (23,3)	142 (5,9)	181 (6,6)
PIC's	91	49	42	88	77	270	347
Porcentaje de variabilidad	12,1	11,2	9,3	11,3	24,6	11,1	12,7

3.3.4.2.2 *trnL – trnF* IGS

El *trnL-trnF* IGS es generalmente mas corto que el *trnL* intrón, variando desde menos de 100 bp en helechos y hepáticas (Stech et al. 2003) hasta por encima de los 500 bp en angiospermas y gimnospermas (Shaw et al. 2005). Aunque esta región suele ser de menor tamaño que el intrón del gen *trnL*, normalmente contiene mayor o igual número de caracteres parsimoniosamente informativos (Bellstedt et al. 2001; Mummenhoff et al. 2001). En nuestro trabajo hemos obtenido que el tamaño de esta región varia entre los 380 pb encontrados en *A. melanthioides*, hasta los 399 pb que se obtuvieron como media en las especies de Sudáfrica oriental (Tabla 3.4). Para alinear estas secuencias fueron necesarios 23 indels, obteniéndose una longitud total alineada de 496 pb (Tabla 3.5a). Para alinear únicamente las secuencias de las especies del género *Androcymbium*, se insertaron 5 zonas con indels, obteniéndose una longitud final de 438 pb (Tabla 3.5b). El porcentaje de variabilidad de esta región con todas las especies analizadas fue del 25,6%. La distribución de zonas variables es bastante homogénea a lo largo de toda la región (Fig. 3.9). La composición nucleotídica media es de un 32,81% de A, 16,25% de C, 15,49% de G y 35,45% de T (Tabla 3.4).

3.3.4.2.3 *trnY – trnD* IGS

El tamaño de esta región varia entre los 316 pb encontrados como media en las especies de Sudafrica occidental, hasta los 376 de *Androcymbium roseum* (Tabla 3.4). Esta región cuenta con un fragmento de 101 pb que se encuentra presente/ausente en las diferentes especies sin un aparente criterio geográfico. Además, para alinear estas secuencias se necesitaron 33 indels, obteniéndose una longitud final alineada de 495 pb (Tabla 3.5a). Para alinear únicamente las especies de las especies del género *Androcymbium*, se insertaron 9 zonas con indels, obteniéndose una longitud final de 451 pb (Tabla 3.5b). El porcentaje de variabilidad de esta región con todas las secuencias analizadas fue del 29,3%. Las zonas mas variables se encuentran en la zona media y cerca del extremo 3' (Fig. 3.9). Su composición nucleotídica media es de un 32,05% de A, 22,48% de C, 15,49% de G y del 30,14% de T (Tabla 3.4).

Fig. 3.9: diversidad nucleotídica (π) de cada una de las regiones analizadas

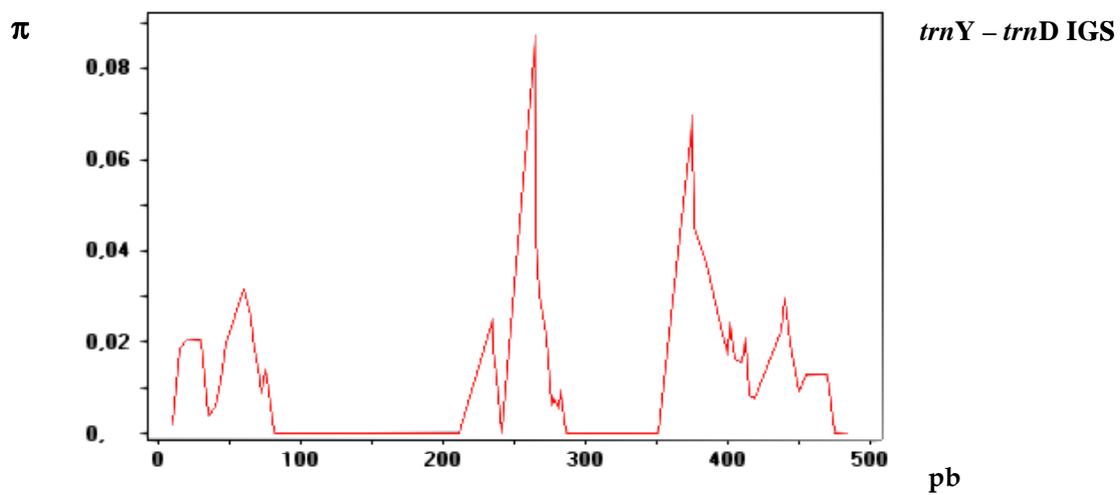
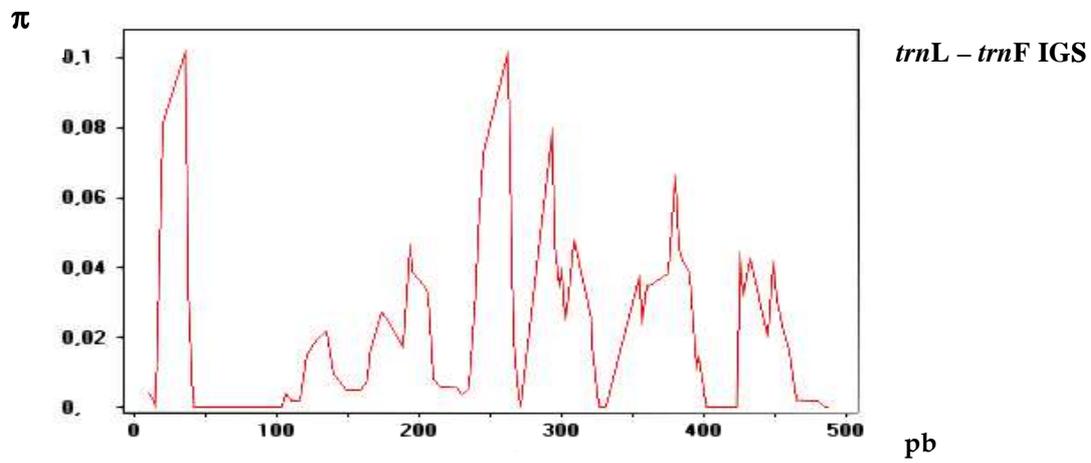
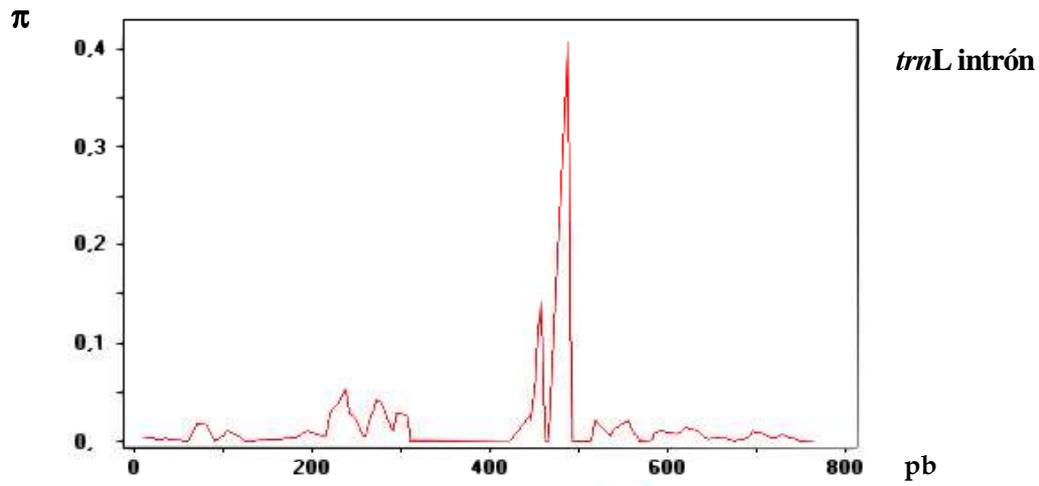
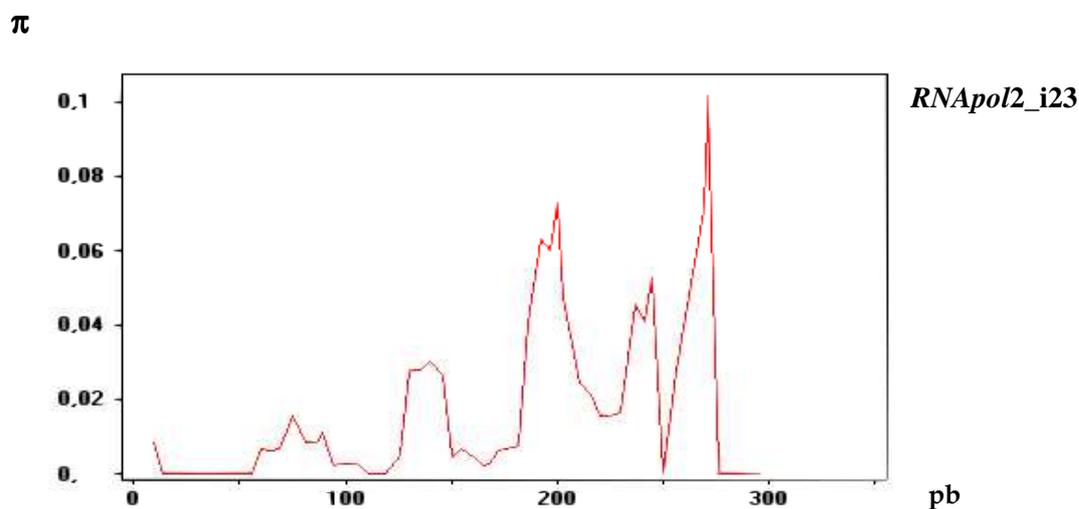
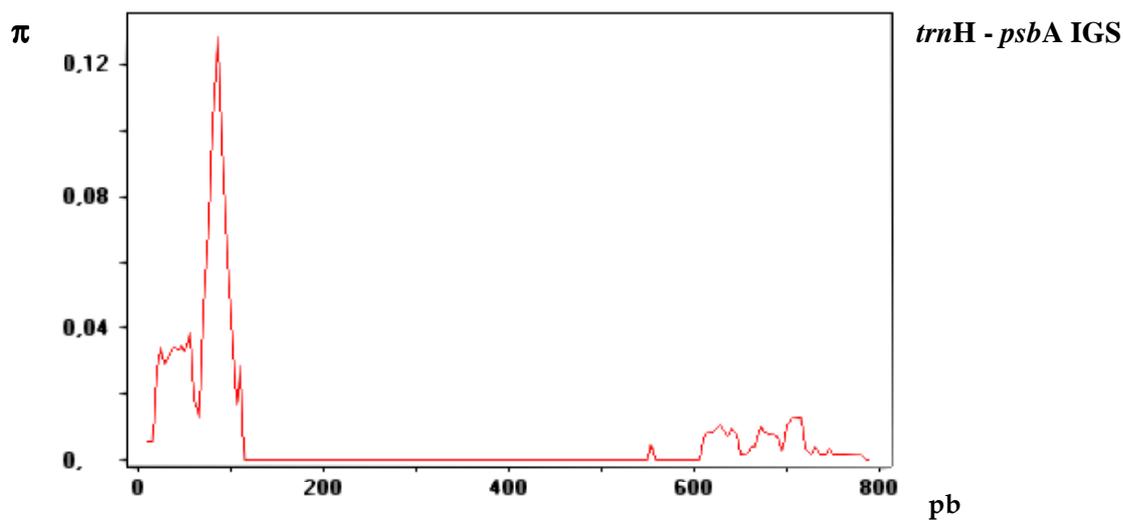


Fig. 3.9: (cont.)



3.3.4.2.4 *trnH - psbA IGS*

El tamaño de esta región varía entre los 341 pb encontrados como media en las especies de Sudáfrica occidental, hasta los 560 pb de *A. roseum* (Tabla 3.4). Para alinear estas secuencias se insertaron 46 indels, la mayoría de ellos en las posiciones centrales de esta región, obteniéndose una longitud final de 798 pb (Tabla 3.5a). Para alinear únicamente las secuencias de las especies del género *Androcymbium*, se insertaron 34 zonas con indels, obteniéndose una longitud final de 782 pb (Tabla 3.5b). El porcentaje de variabilidad de esta región con todas las especies analizadas es del 20,4%. La zona más variable se encuentra próxima al extremo 5' (Fig. 3.9). La

composición nucleotídica media es de un 31,64% de A, 15,89% de C, 20,31% de G y 32,16% de T (Tabla 3.4).

3.3.4.3 GENES NUCLEARES

3.3.4.3.1 *RNApol2_i23*

El tamaño de esta región varía entre 308 pb y 300 pb (Tabla 3.4). Para poder alinear todas las secuencias se insertaron 10 zonas con indels, obteniéndose una longitud total, una vez alineadas, de 314 pb (Tabla 3.5a). Para alinear únicamente las secuencias de las especies del género *Androcymbium*, se insertaron 6 zonas con indels, obteniéndose una longitud final de 313 pb (Tabla 3.5b). El porcentaje de variabilidad de esta región con todas las secuencias analizadas fue del 29,9%, el mas alto de todas las regiones secuenciadas. Las zonas mas variables se encuentran próximas al extremo 3' (Fig. 3.9). Su composición nucleotídica media es de un 28,15% de A, 16,69% de C, 21,75% de G y 33,41% de T (Tabla 3.4).

3.3.5 Análisis filogenéticos

3.3.5.1 FILOGENIA MEDIANTE MÁXIMA PARSIMONIA

Para realizar el árbol de máxima parsimonia, se analizaron los datos de las diferentes secuencias de forma conjunta (*trnL* intrón, *trnL* – *trnF* IGS, *trnY* – *trnD* IGS, *trnH* – *psbA* IGS y *RNApol2_i23*) y de forma separada para cada uno de los genomas estudiados (cpDNA y nDNA). Los indels fueron codificados como caracteres binarios 0/1, integrándolos así en el análisis.

Para el análisis de las diferentes secuencias de forma conjunta se obtuvo un árbol bootstrap estricto consenso con valores obtenidos de CI = 0,734, RI = 0,764 (Fig. 3.10); con el análisis de las secuencias del DNA cloroplástico se obtuvo un árbol bootstrap estricto consenso con valores obtenidos de CI = 0,723, RI = 0,750 (Fig. 3.11); y con el análisis de las secuencias del DNA nuclear se obtuvo un árbol bootstrap estricto consenso con valores obtenidos de CI = 0,618, RI = 0,707 (Fig. 3.12).

En el árbol filogenético obtenido a partir del análisis de todas las secuencias de forma conjunta, se pueden observar cinco clados (Fig. 3.10). El 75% de las especies estudiadas del género *Androcymbium* encuentran formando el Clado 1 (BS = 69%). Dentro de este Clado se pueden hacer dos subdivisiones soportadas por un elevado

valor de bootstrap. La primera (Clado 1A; BS = 94%) es formado por las especies del norte de África, Sudáfrica oriental, dos especies de Namibia (*A. asteroides* y *A. roseum*) y una especie que cuenta con poblaciones en ambos extremos del cono sur de África (*A. austrocapense*). En la segunda subdivisión dentro de este Clado 1 encontramos a 10 especies que habitan en Sudáfrica occidental (Clado 1B; BS = 87%). El Clado 2 (BS = 79%) está formado por cuatro especies de género *Androcymbium* que habitan en una pequeña zona del norte de Sudáfrica oriental, entre los meridianos 17° - 18° E y los paralelos 28° - 30° S (Fig. 3.1b). Cabe destacar la presencia de *A. dregei*, especie de Sudáfrica occidental, en un mismo Clado que el resto de especies de la tribu *Colchiceae* analizadas, las cuales fueron recolectadas en la Península Ibérica y Baleares (Clado 5; BS = 63%). El Clado que agrupa a todas las especies de la tribu *Colchiceae* se encuentra muy bien soportado por un valor de bootstrap del 99% (Fig. 3.10). En la posición mas basal encontramos al resto de especies analizadas de la familia Colchicaceae y a la especie *Alstroemeria aurantiaca*, de la familia Alstroemeriaceae.

El árbol filogenético obtenido a partir del análisis con métodos de máxima parsimonia de las secuencias del DNA cloroplástico es muy parecido al anteriormente descrito (Fig 3.11). La única diferencia que se observa es que las especies que formaban los Clados 2, 3, 4 y 5 en el anterior árbol, en este quedan agrupadas dentro de un mismo clado, el Clado 2 (BS = 58%), agrupándose conjuntamente especies del género *Androcymbium* con especies de los géneros *Bulbocodium*, *Colchicum* y *Merendera*, todos ellos pertenecientes a la tribu *Colchiceae*. En este árbol también se puede observar que el Clado que agrupa a todas las especies de la tribu *Colchiceae* se encuentra soportado por un elevado valor bootstrap (BS = 100%). El resto de especies de la familia Colchicaceae y la especie de la familia Alstroemeriaceae quedan en posición basal respecto al resto.

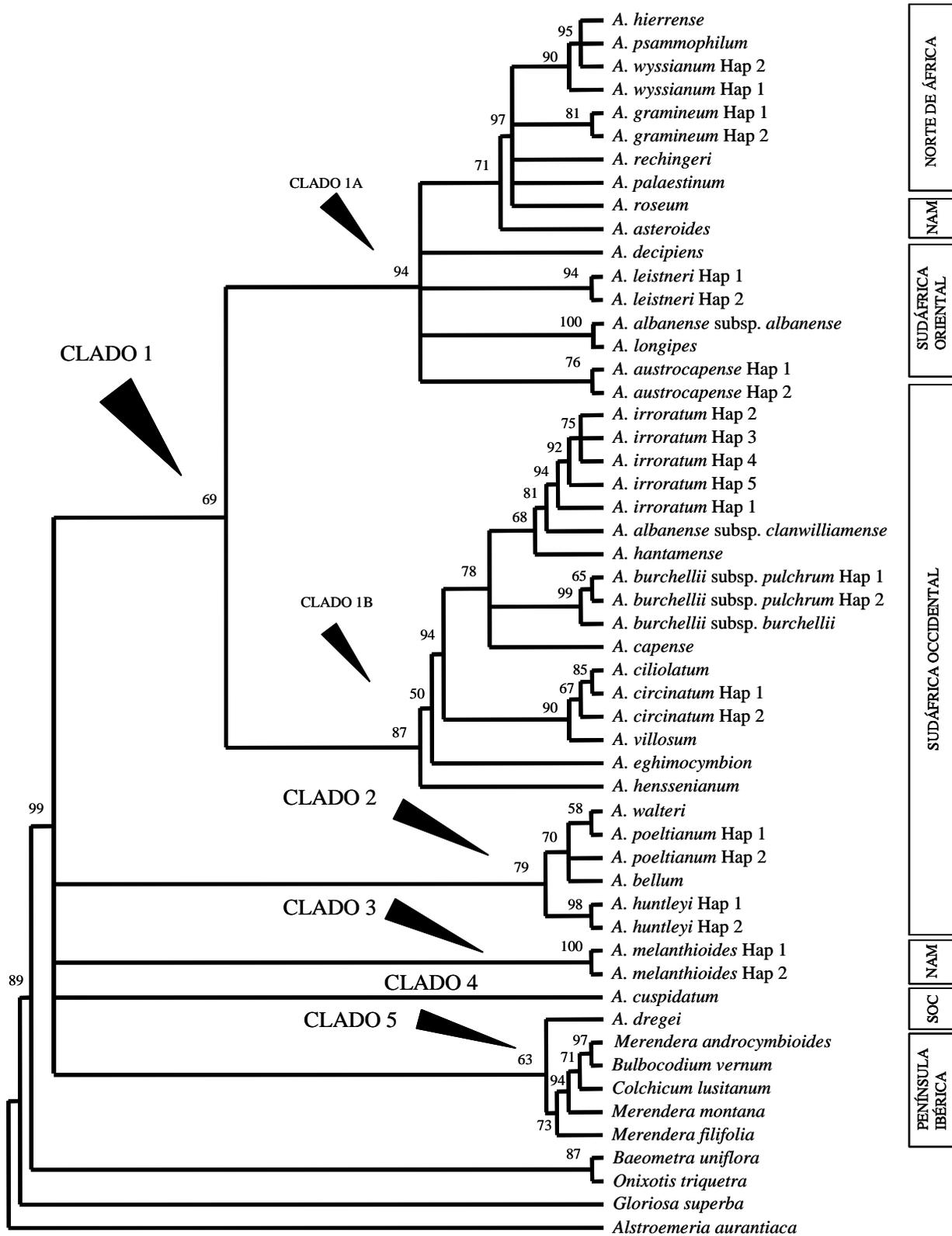


Fig. 3.10: árbol bootstrap estricto consenso realizado a partir del análisis de los datos de las cinco secuencias de forma conjunta y con métodos de máxima parsimonia. Se realizaron 1000 análisis bootstrap limitando el número de árboles a 5000 en cada repetición. El valor bootstrap de robustez se encuentra indicado encima de cada rama. CI = 0,734; RI = 0,764. NAM = Namibia; SOC = Sudáfrica occidental.

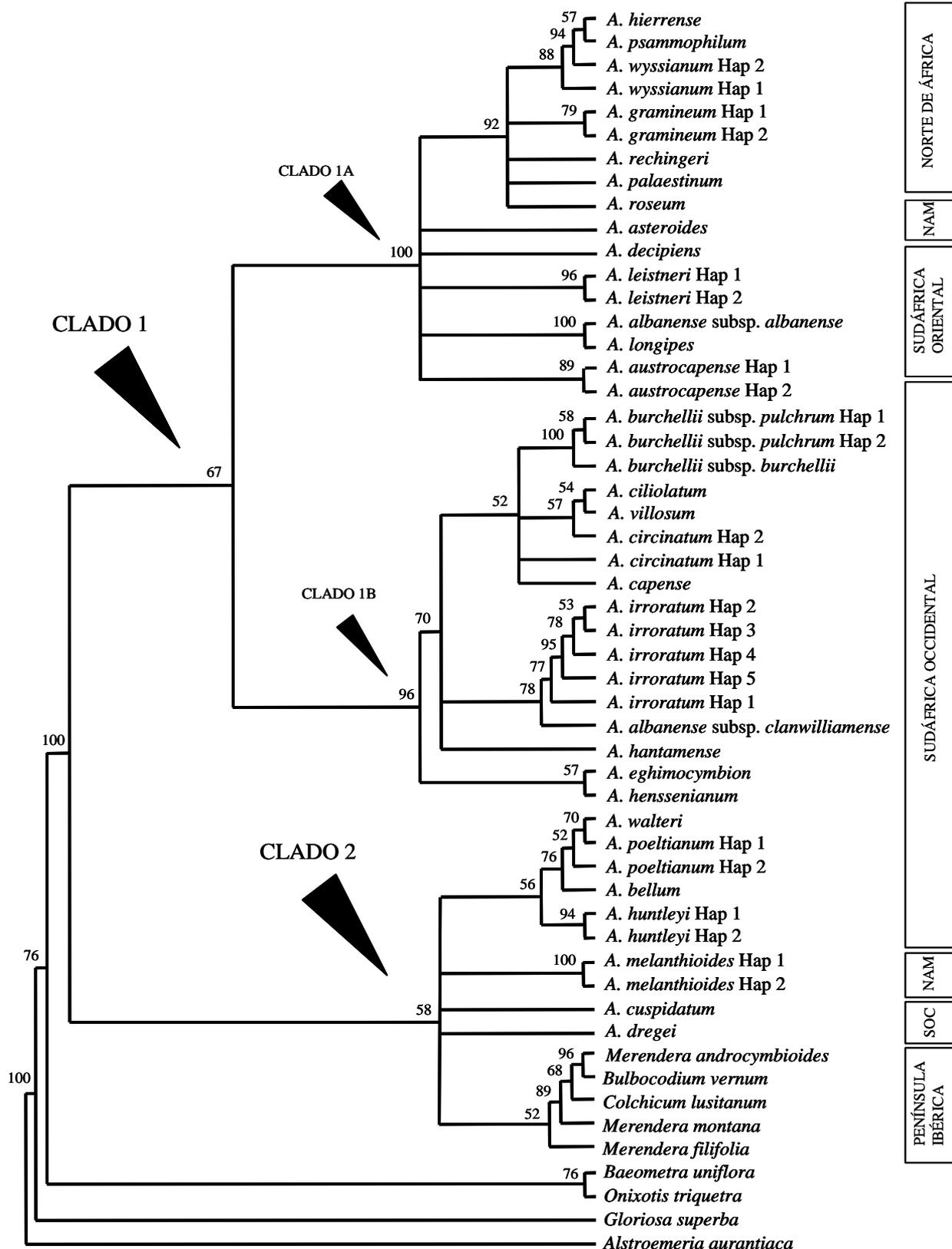


Fig. 3.11: árbol bootstrap estricto consenso realizado con todas las secuencias del DNA cloroplástico y con métodos de máxima parsimonia. Se realizaron 1000 análisis bootstrap limitando el número de árboles a 5000 en cada repetición. El valor bootstrap de robustez se encuentra indicado encima de cada rama. CI = 0,723; RI = 0.750. NAM = Namibia; SOC = Sudáfrica occidental.

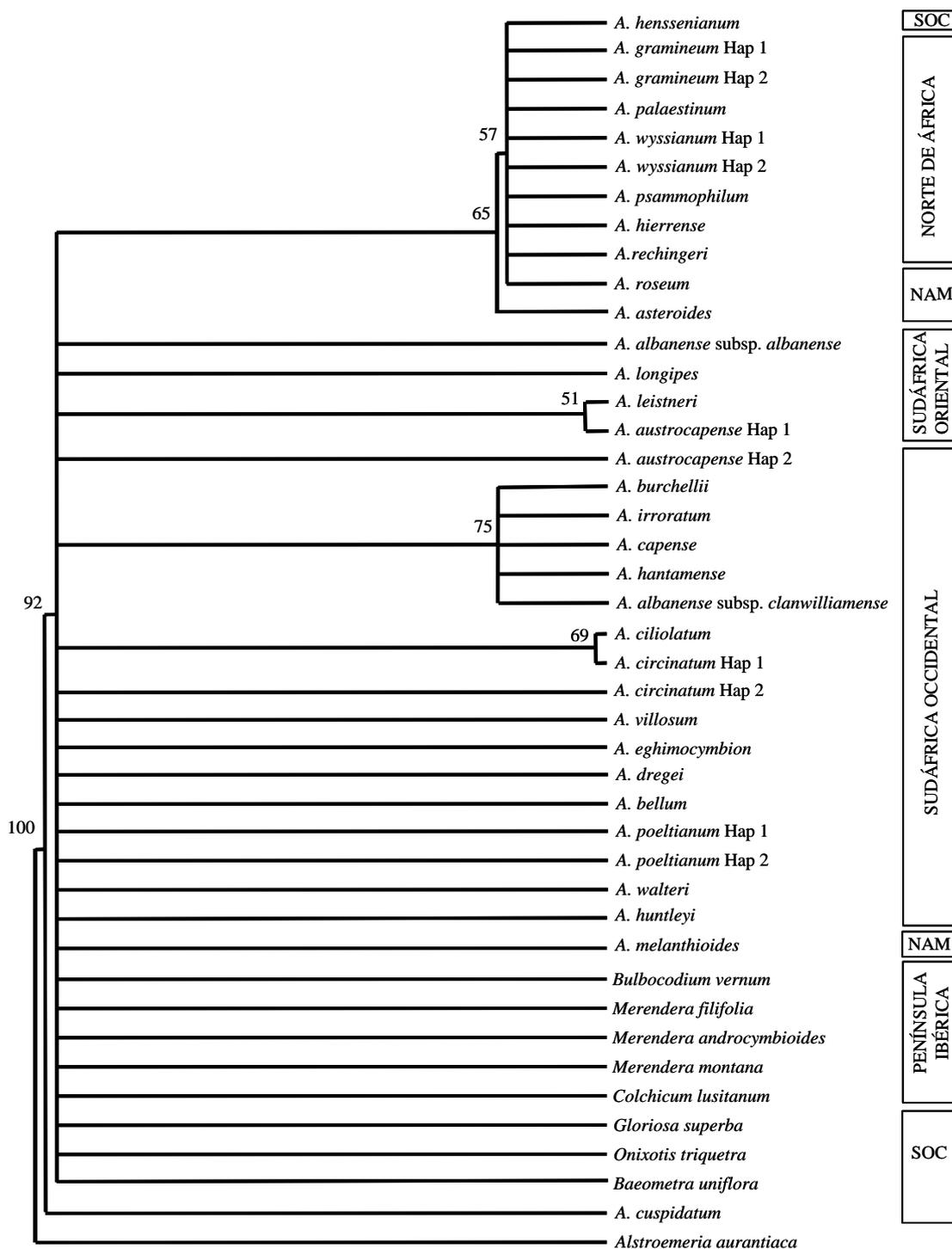


Fig. 3.12: árbol bootstrap estricto consenso realizado con todas las secuencias del DNA nuclear y con métodos de máxima parsimonia. Se realizaron 1000 análisis bootstrap limitando el número de árboles a 5000 en cada repetición. El valor bootstrap de robustez se encuentra indicado encima de cada rama. CI = 0,618; RI = 0.707. NAM = Namibia; SOC = Sudáfrica occidental.

El árbol filogenético obtenido a partir del análisis de las secuencias del DNA nuclear (*RNApol2_i23*) presenta muy poca resolución en relación a los otros dos, dada la poca cantidad de datos utilizados en su análisis (Fig. 3.12). Cabe destacar la presencia de la especie *A. henssenianum* en el mismo clado que las especies del norte de África y *A. roseum*, y la presencia en posición basal de *A. cuspidatum*.

3.3.5.2 INFERENCIA BAYESIANA

3.3.5.2.1 Resultados del LRT

Los resultados del LRT indicaban que el modelo que mas maximizaba el valor de probabilidad para el análisis conjunto de las cinco regiones secuenciadas era el HKY+I+ Γ (Hasegawa et al. 1985) (Tabla 3.6). Por lo tanto y para hacer el análisis, se tuvieron en cuenta los parámetros ts/tv (diferencia de tasas entre transiciones y transversiones nucleotídicas), Γ (gamma: heterogeneidad evolutiva dentro de las secuencias), I (proporción de zonas invariables) y frecuencias nucleotídicas no iguales ($A \neq C \neq G \neq T$). Los valores de estos parámetros son estimados en función de su valor de probabilidad a posteriori.

Para analizar conjuntamente los datos de las secuencias de DNA cloroplástico, el LRT nos indicó que el mejor modelo era el HKY+I+ Γ mientras que para analizar los datos del DNA nuclear el mejor modelo es el HKY+ Γ (Hasegawa et al. 1985) (Tabla 3.6). Este último modelo es idéntico al utilizado en el anterior análisis con la única diferencia que no contempla la existencia de zonas invariables. El modelo que se ajusta mejor para analizar los datos procedentes del *trnL-trnF* IGS, del *trnY-trnD* IGS y del *trnH-psbA* IGS es el HKY+ Γ (Hasegawa et al. 1985) (Tabla 3.6). El modelo que mejor se ajusta para analizar los datos procedentes del *trnL* intrón es el F81+I+ Γ (Felsenstein 1981). Este modelo es idéntico al utilizado en el primer análisis con la diferencia que no contempla una diferenciación entre tasas de transiciones y transversiones nucleotídicas. Debido a la poca diferencia de parámetros evolutivos de los modelos de sustitución nucleotídica entre las cinco regiones secuenciadas y a que una sobreestima en el número de parámetros para analizar los datos con inferencia Bayesiana no tiene ningún efecto en el resultado final (Ronquist et al. 2005), el modelo evolutivo elegido para analizar los datos procedentes de secuencias

de DNA, tanto cloroplástico como nuclear, fue el HKY+I+ Γ (Hasegawa et al. 1985), con la diferencia que en este caso en cada región se estiman sus propios parámetros.

Para analizar los datos de DNA de las cinco regiones secuenciadas, tanto conjuntamente como de forma separada, con inferencia Bayesiana y predeterminando a priori los valores de los parámetros del modelo evolutivo de sustitución nucleotídica elegido, se hizo a partir de los valores obtenidos con el LRT (Tabla 3.6).

Tabla 3.6: modelo evolutivo y parámetros calculados a priori con el LRT para cada una de las regiones secuenciadas y de forma conjunta.

REGIÓN	MODELO	PARÁMETROS						
		Ts/Tv	I	Γ	FRECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS			
					A	C	G	T
Conjunto	HKY+I+ Γ	0,8431	0,4710	0,7621	0,3386	0,1651	0,1606	0,3357
cpDNA	HKY+I+ Γ	0,6734	0,4767	0,7862	0,3502	0,1612	0,1539	0,3346
<i>trnL</i> intrón	F81+I+ Γ	-	0,5197	0,6901	0,3850	0,1347	0,1460	0,3343
<i>trnL</i> + <i>trnF</i> IGS	HKY+ Γ	0,9702	-	0,3151	0,3301	0,1531	0,1443	0,3725
<i>trnY</i> + <i>trnD</i> IGS	HKY+ Γ	0,7933	-	0,3588	0,3407	0,2070	0,1524	0,2999
<i>psbA</i> - <i>trnH</i> IGS	HKY+ Γ	0,7969	-	0,2593	0,3315	0,1646	0,1735	0,3304
<i>RNAPol2_i23</i>	HKY+ Γ	1,9973	-	0,3696	0,2645	0,1812	0,2151	0,3392

3.3.5.2.2 Parámetros estimados a posteriori

Se obtuvieron varios árboles filogenéticos con inferencia Bayesiana estimando los parámetros del modelo evolutivo a posteriori. Estos fueron realizados analizando los datos de diferentes formas: (i) utilizando las secuencias de las cinco regiones analizadas (Fig. 3.13), (ii) a partir de las secuencias del DNA cloroplástico (Fig. 3.14) y (iii) únicamente con las secuencias del DNA nuclear (Fig. 3.15). Utilizando los datos de las cinco regiones secuenciadas se obtuvieron dos árboles; un primer árbol se realizó a analizando conjuntamente las cinco regiones bajo el modelo evolutivo de HKY+I+ Γ (Hasegawa et al. 1985) y estimando el valor de los parámetros del modelo evolutivo para todos los datos de forma conjunta (Fig. 3.13a), mientras que un segundo árbol se obtuvo analizando por separado cada uno de los cinco conjuntos de datos con su propio modelo evolutivo de sustitución nucleotídica, el determinado por el LRT, y estimando a posteriori valores diferentes de los parámetros de cada modelo evolutivo para cada una de las secuencias (Fig. 3.13b). Los datos de las

cuatro secuencias del DNA cloroplástico también se analizaron de la misma manera (Fig. 3.14). También se obtuvo un árbol filogenético únicamente con las secuencias del DNA nuclear (Fig. 3.15) y para cada una de las cuatro regiones secuenciadas del DNA cloroplástico (Fig. 3.16).

Los dos árboles obtenidos a partir del análisis conjunto de los datos de las secuencias presentaron la misma topología (Fig. 3.13). Las únicas diferencias se encuentran en los valores de probabilidad a posteriori (PP) que soportan las agrupaciones de los taxa, aunque estas no fueron muy grandes. En los dos árboles se pueden observar dos Clados claramente diferenciados, al igual que en el árbol de máxima parsimonia obtenido a partir de los datos de las secuencias de DNA cloroplástico, pero con valores mas altos de robustez de nodos y mejor resolución interna de los clados. Así para el Clado 1 tenemos valores de probabilidad a posteriori (PP) del 90% y 83% (datos analizados de forma conjunta (Fig. 3.13a) y separada (Fig. 3.13b) respectivamente), y está formado por las mismas especies que se observaban en el árbol de MP. La división de este Clado en dos subclados (Clado 1A y Clado 1B) también es idéntica que en el árbol de MP, aunque se observa una mejor resolución de las relaciones filogenéticas entre los taxa dentro de los clados y una mayor robustez de los nodos. El Clado 2 también esta formado por las mismas especies que se observan en el árbol de MP obtenido a partir de las secuencias de DNA cloroplástico, pero soportado por un valor mas alto de PP (77% para el árbol obtenido a partir de los datos de las secuencias analizados de forma conjunta y 89% para el árbol obtenido a partir de los datos de las secuencias analizados de forma separada). La diferencia mas importante está en la aparición de forma conjunta en un mismo clado de *A. cuspidatum* y *A. dregei* con el resto de especies analizadas de la tribu *Colchiceae*.

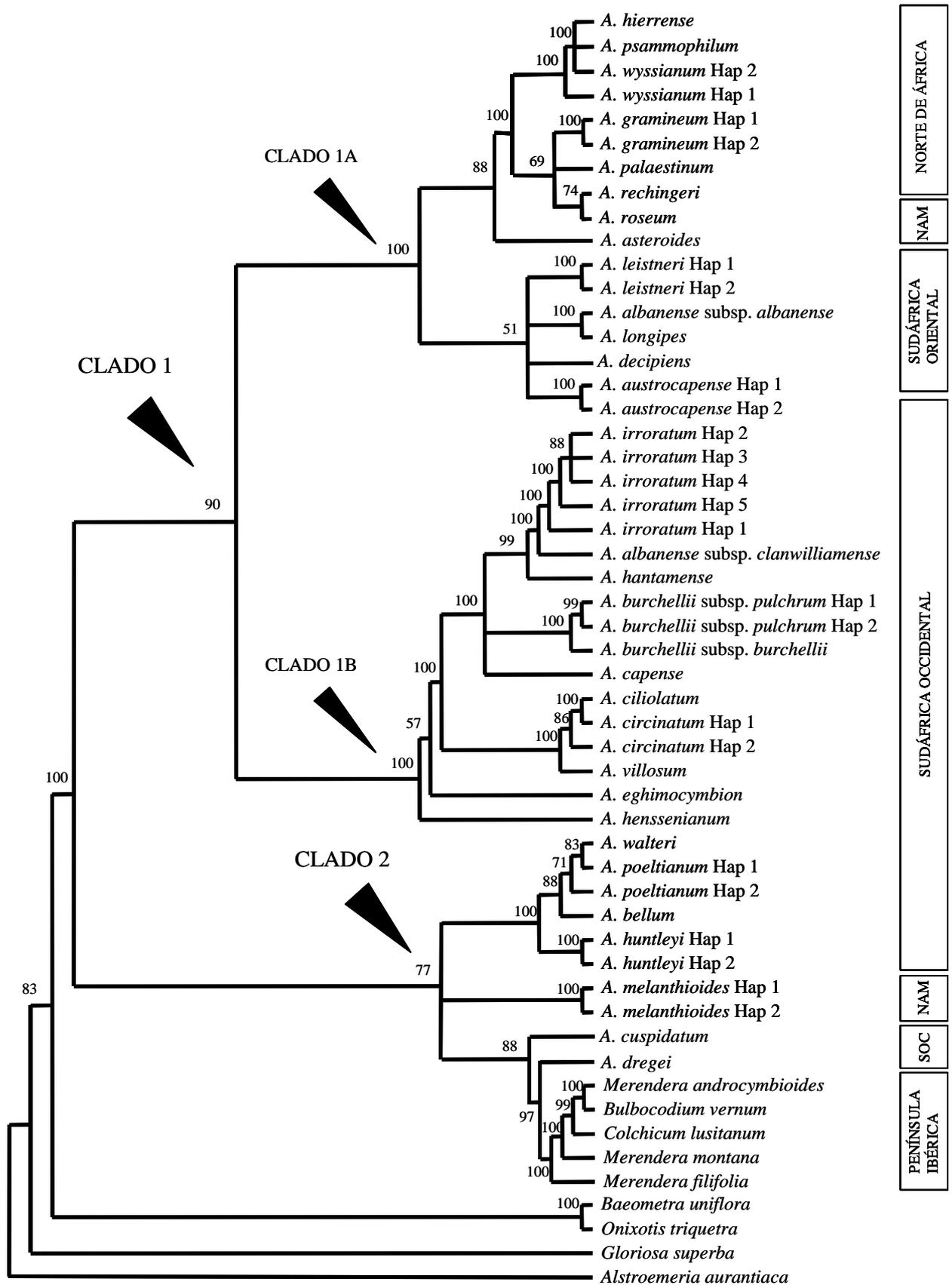


Fig. 3.13a: árbol filogenético realizado con inferencia Bayesiana analizando todos los datos de forma conjunta. Valores de robustez de probabilidad a posteriori (PP) situados encima de las ramas. N° de generaciones = 1.500.000; *thin* = 100; *burnin* = 3.000. NAM: Namibia; SOC: Sudáfrica occidental.

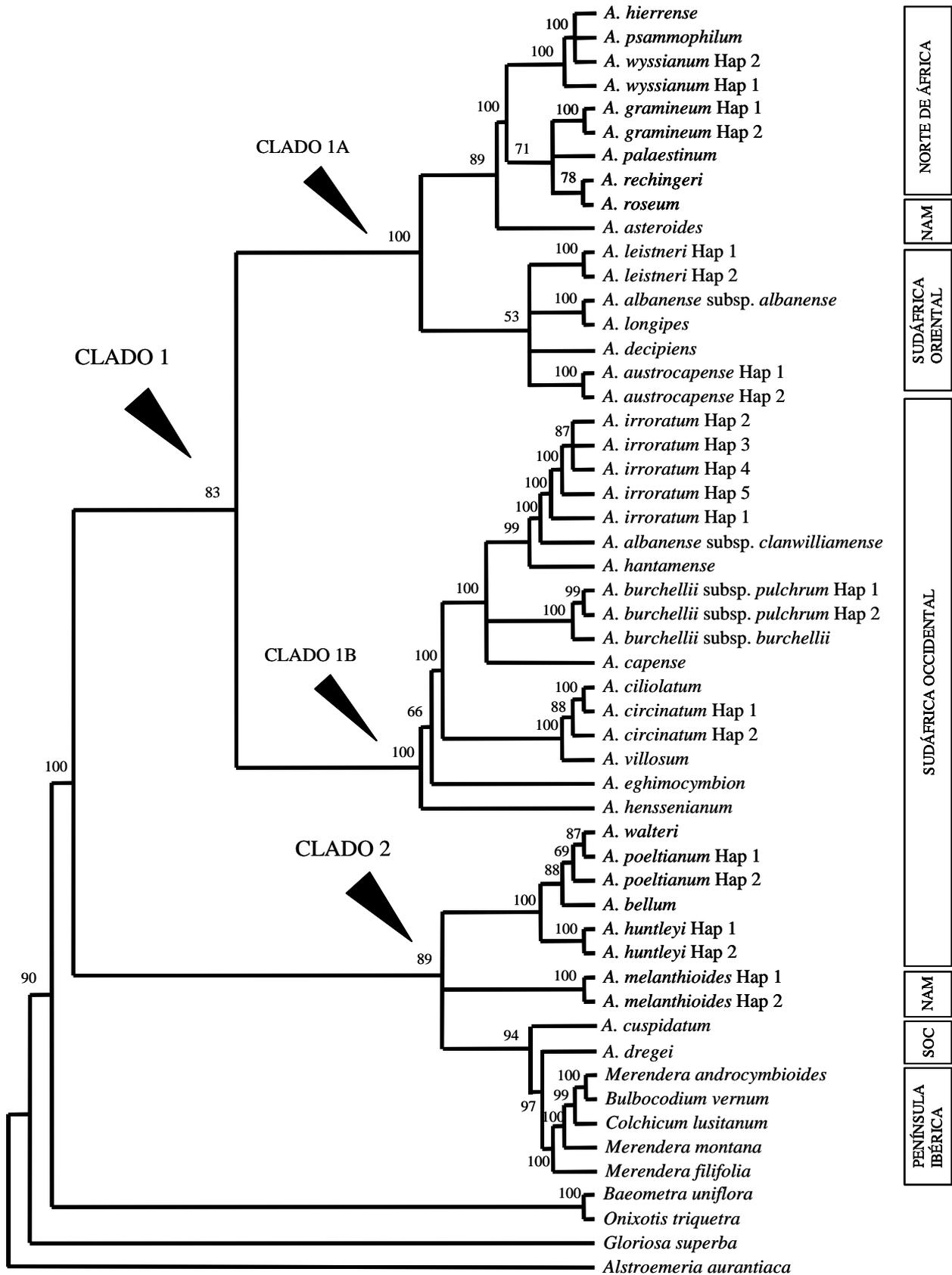


Fig. 3.13b: árbol filogenético realizado con inferencia Bayesiana analizando todos los datos de forma separada. Valores de robustez de probabilidad a posteriori (PP) situados encima de las ramas. N° de generaciones = 1.500.000; *thin* = 100; *burnin* = 3.000. NAM: Namibia; SOC: Sudáfrica occidental.

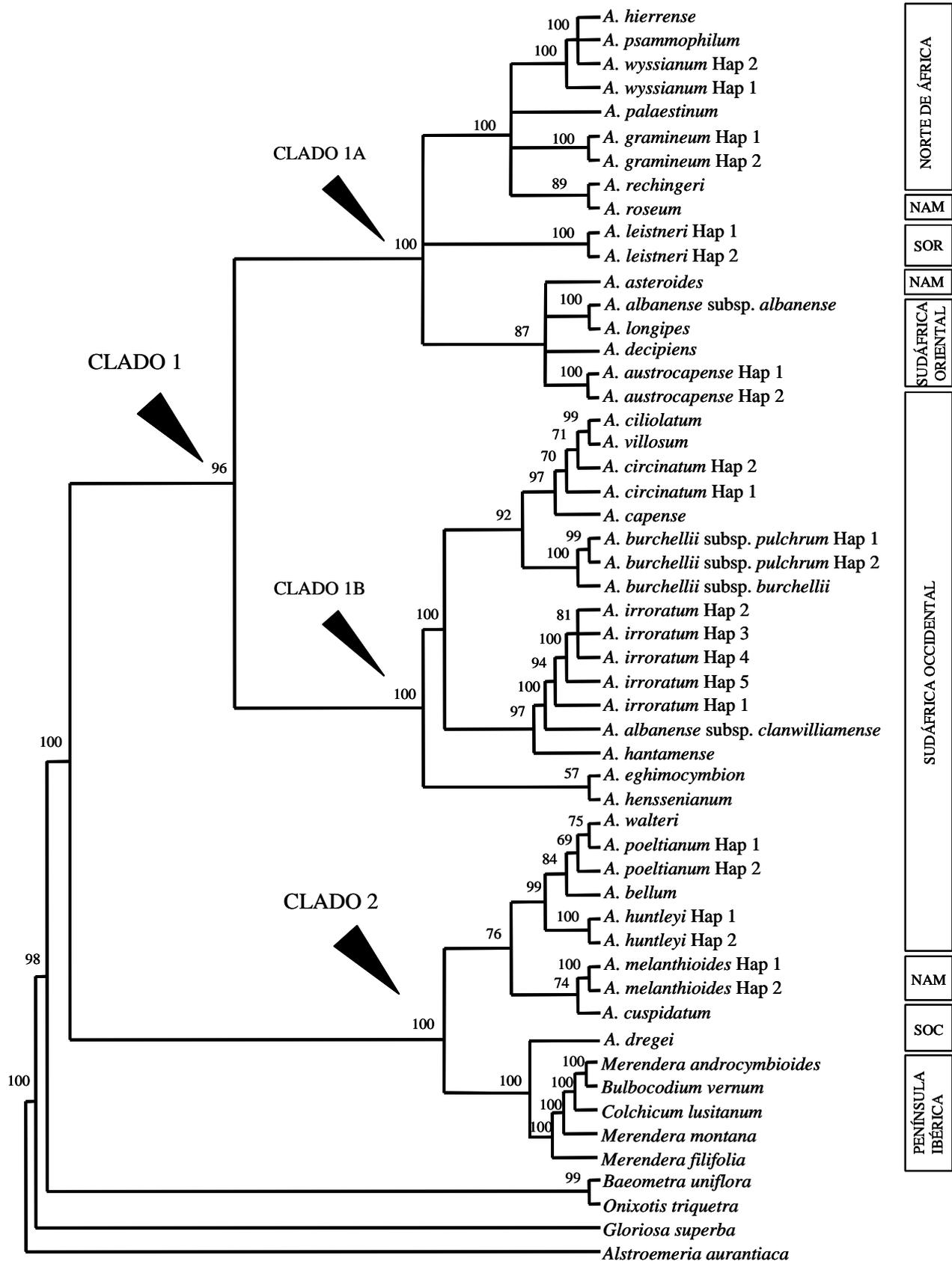


Fig. 3.14a: árbol filogenético realizado con inferencia Bayesiana analizando los datos del DNA cloroplástico de forma conjunta. Valores de robustez de probabilidad a posteriori (PP) situados encima de las ramas. N° de generaciones = 1.500.000; *thin* = 100; *burnin* = 3.000. NAM: Namibia; SOR: Sudáfrica oriental; SOC: Sudáfrica occidental.

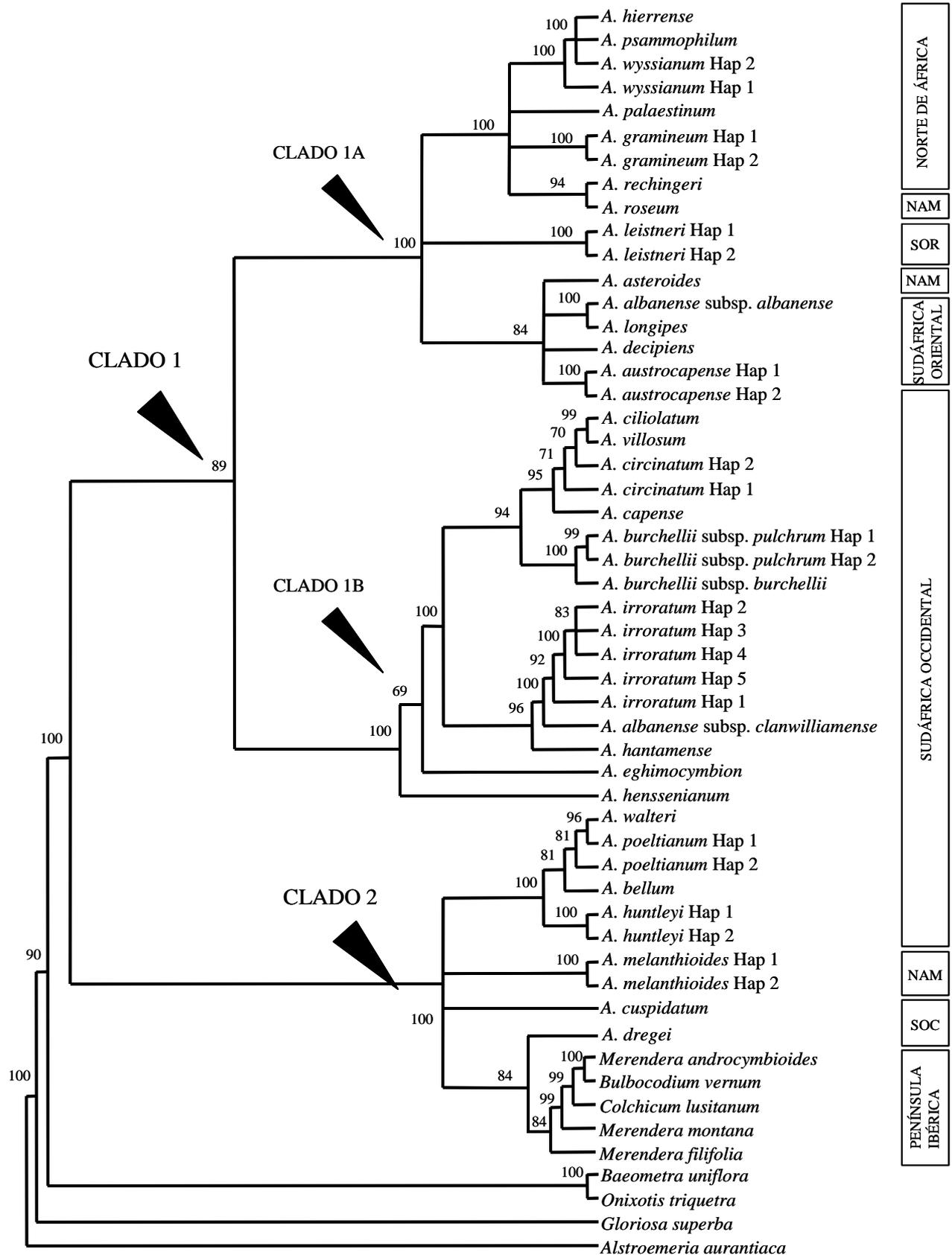


Fig. 3.14b: árbol filogenético realizado con inferencia Bayesiana analizando los datos del DNA cloroplástico de forma separada. Valores de robustez de probabilidad a posteriori (PP) situados encima de las ramas. N° de generaciones = 1.500.000; *thin* = 100; *burnin* = 3.000. NAM: Namibia; SOR: Sudáfrica oriental; SOC: Sudáfrica occidental.

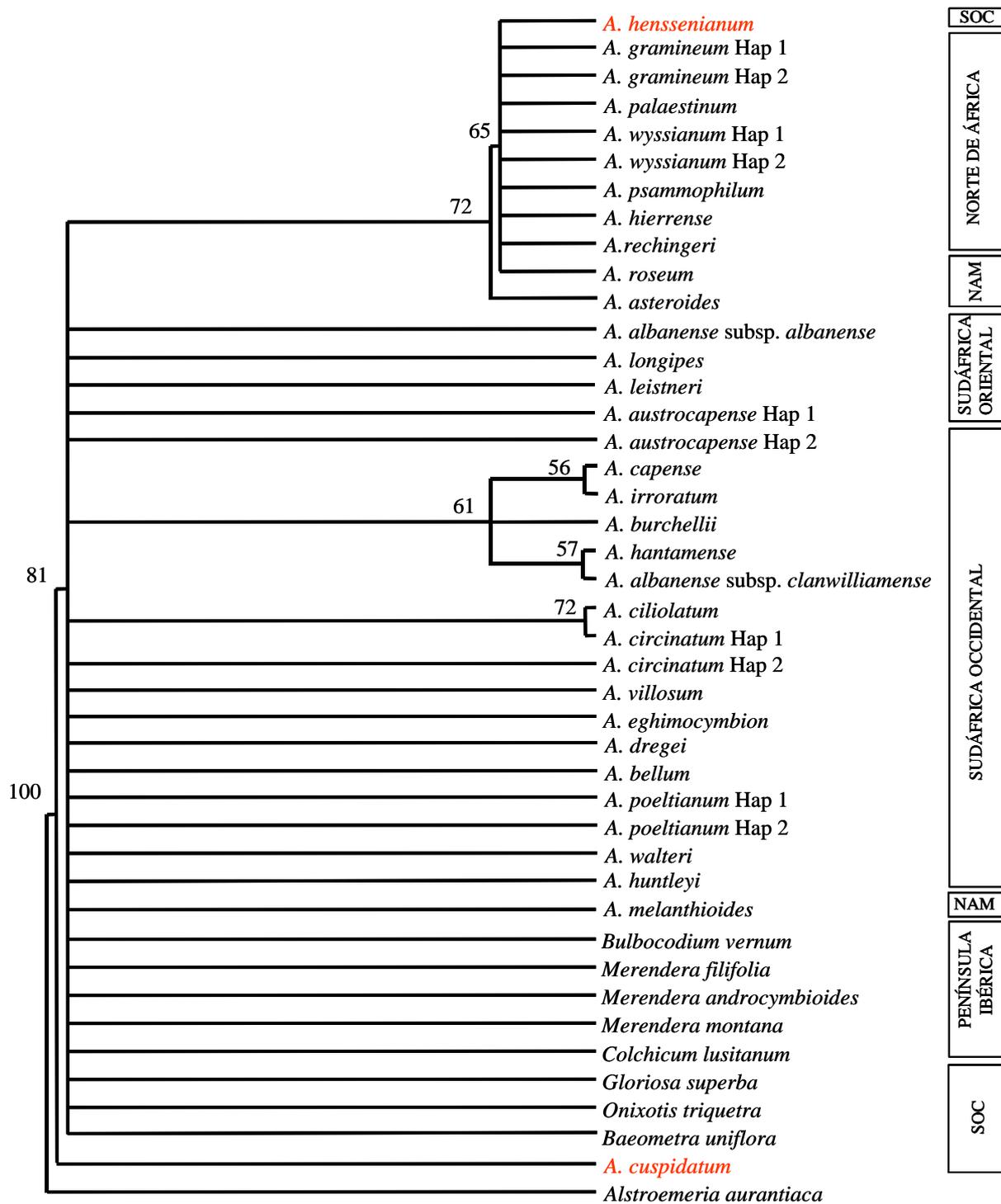


Fig. 3.15: árbol filogenético realizado con inferencia Bayesiana analizando los datos del DNA nuclear. Valores de robustez de probabilidad a posteriori (PP) situados encima de las ramas. N° de generaciones = 1.500.000; *thin* = 100; *burnin* = 3.000. NAM: Namibia; SOR: Sudáfrica oriental; SOC: Sudáfrica occidental. En rojo partes conflictivas (ver apartado 3.3.7.2).

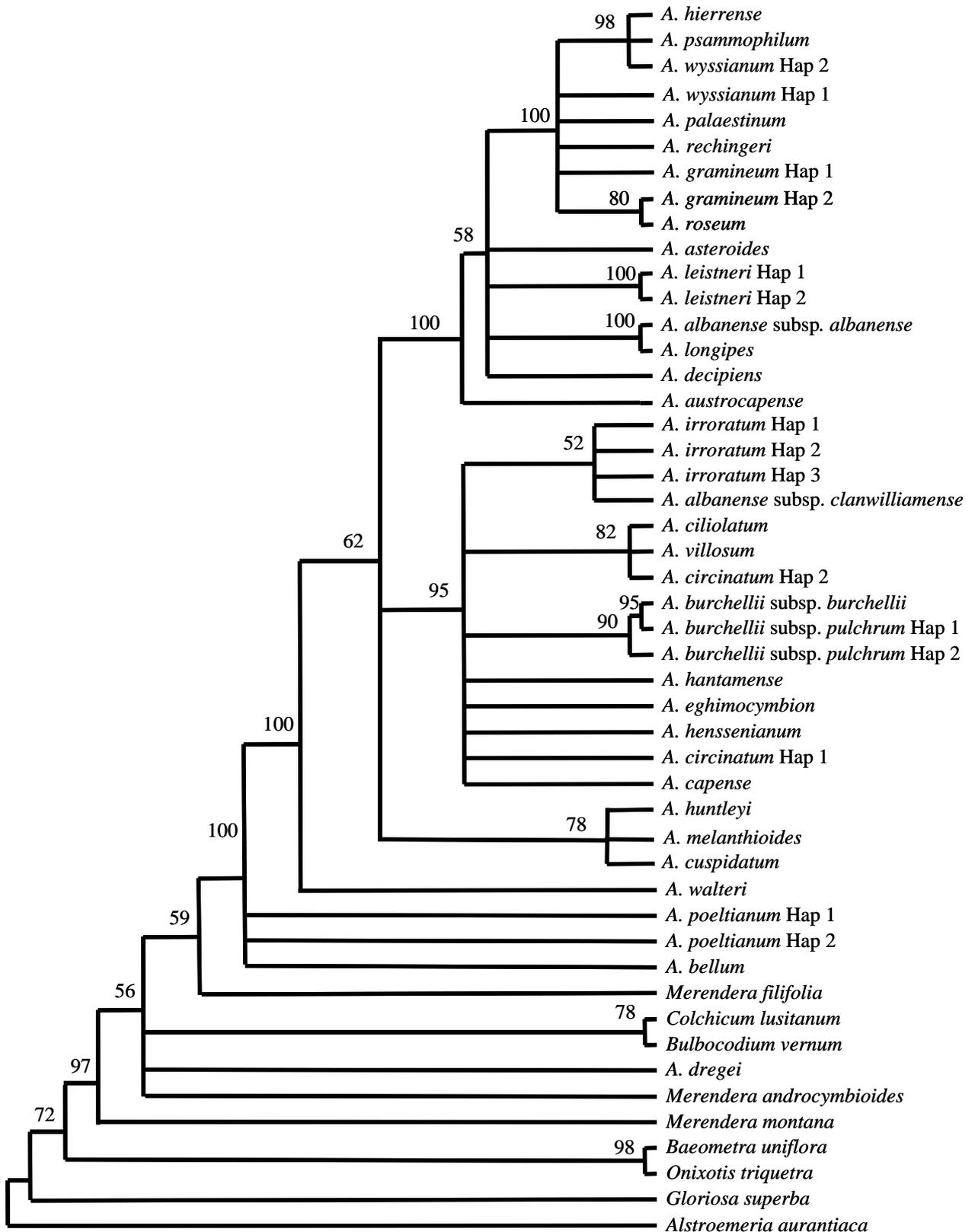


Fig. 3.16a: árbol filogenético realizado con inferencia Bayesiana analizando los datos del *trnL* intrón. Valores de robustez de probabilidad a posteriori (PP) situados encima de las ramas. N° de generaciones = 1.500.000; *thin* = 100; *burnin* = 3.000.

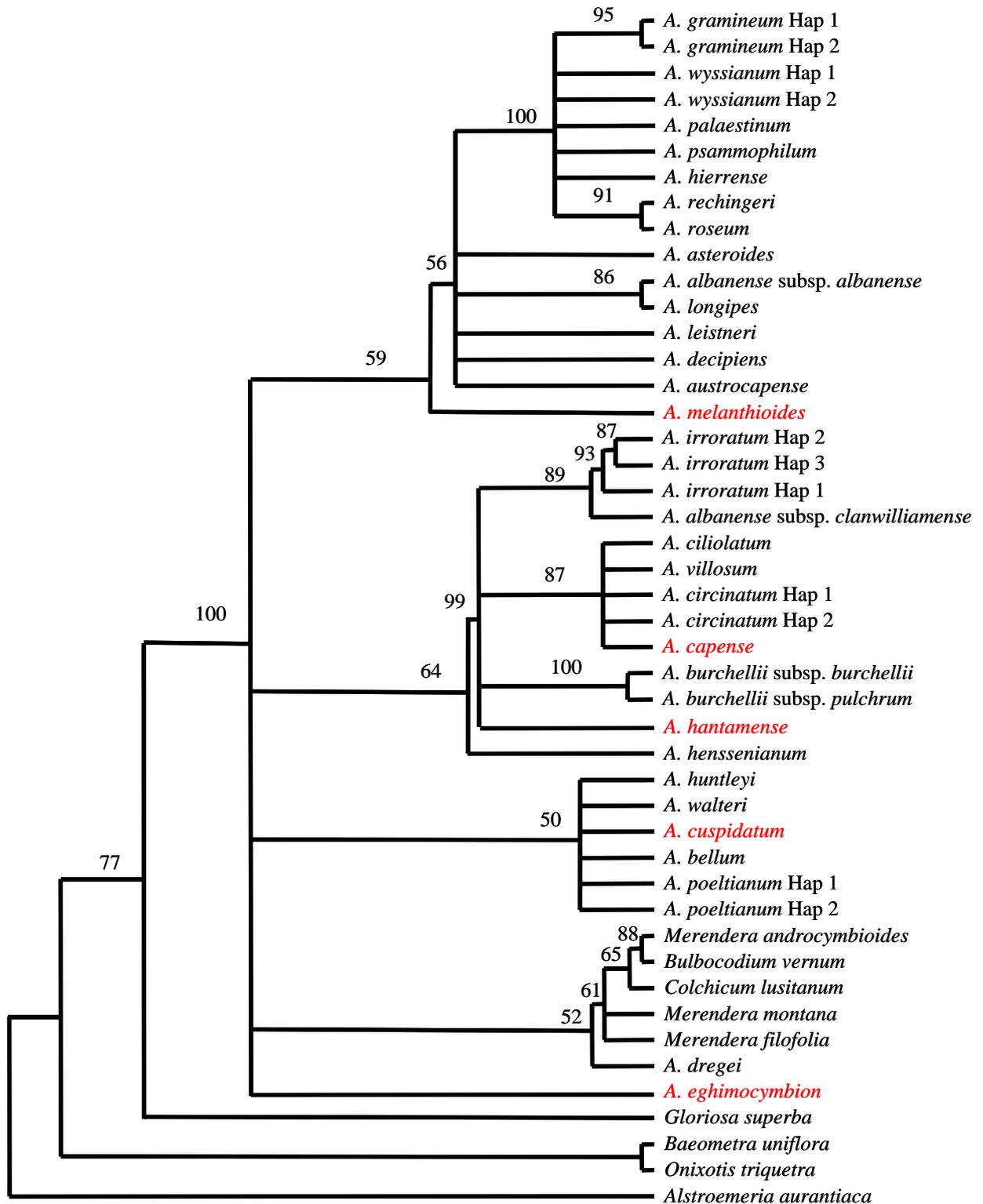


Fig. 3.16b: árbol filogenético realizado con inferencia Bayesiana analizando los datos del *trnL* – *trnF* IGS. Valores de robustez de probabilidad a posteriori (PP) situados encima de las ramas. N° de generaciones = 1.500.000; *thin* = 100; *burnin* = 3.000. En rojo partes conflictivas (ver apartado 3.3.7.2).

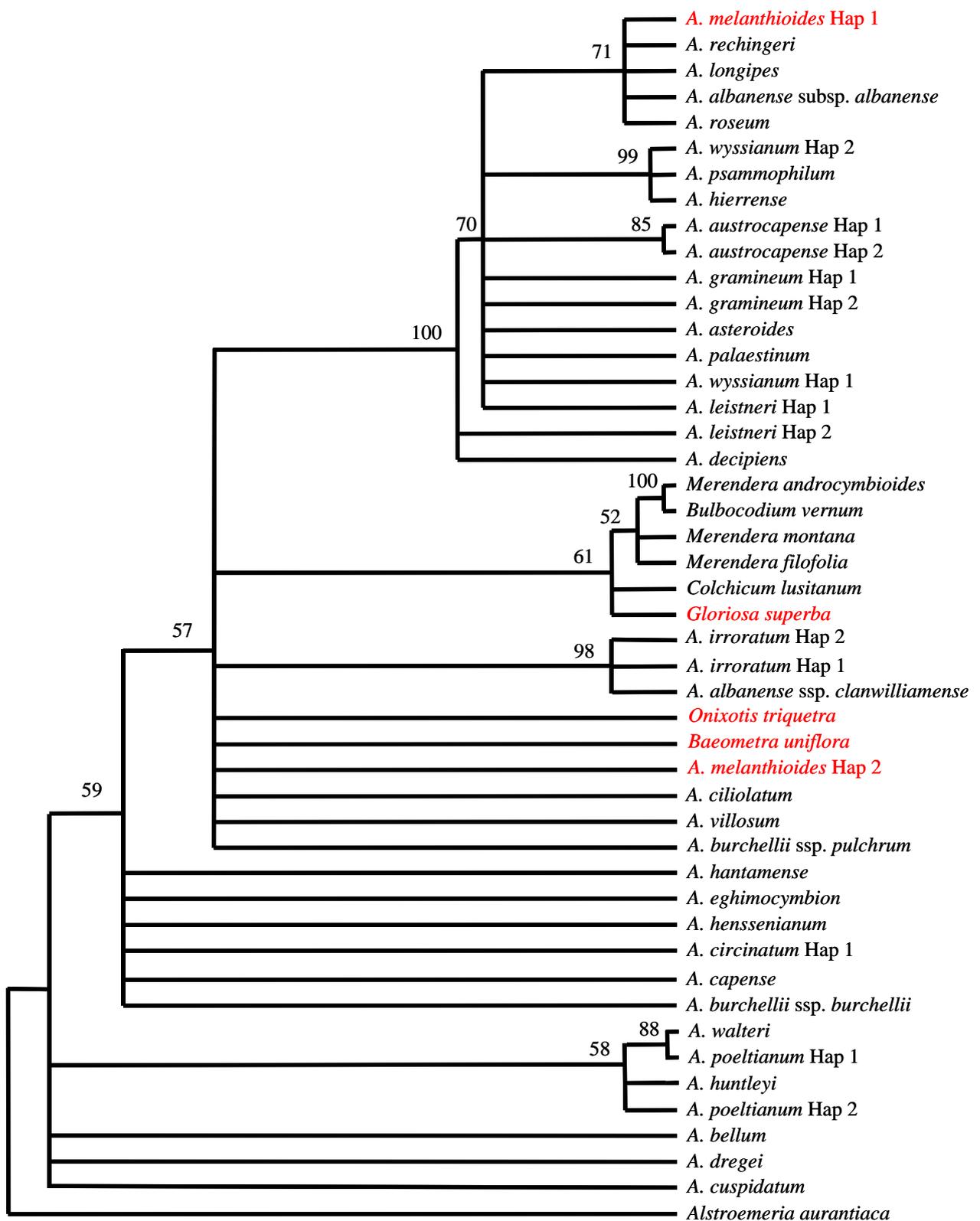


Fig. 3.16c: árbol filogenético realizado con inferencia Bayesiana analizando los datos del *trnY* – *trnD* IGS. Valores de robustez de probabilidad a posteriori (PP) situados encima de las ramas. N° de generaciones = 1.500.000; *thin* = 100; *burnin* = 3.000. En rojo partes conflictivas (ver apartado 3.3.7.2).

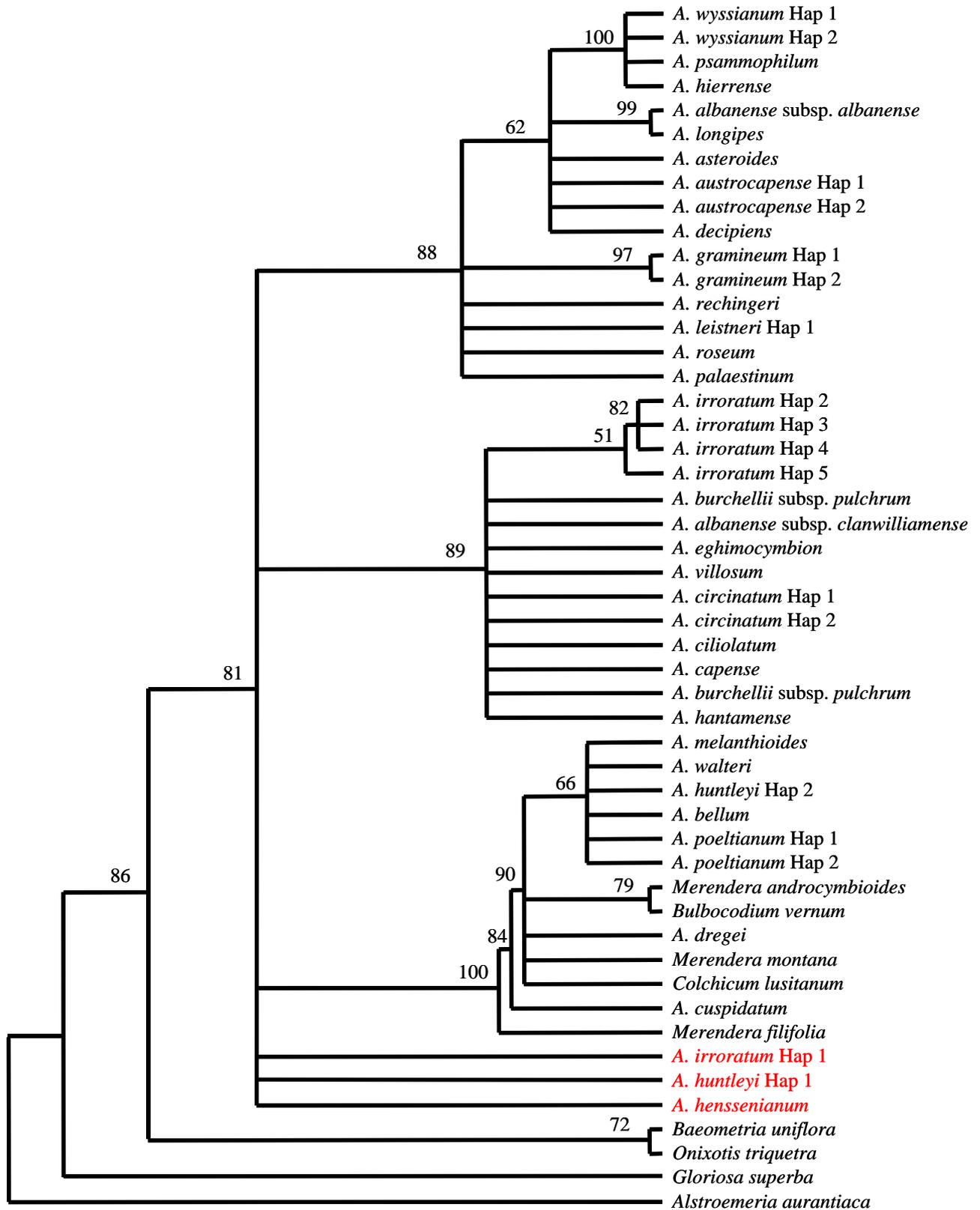


Fig. 3.16d: árbol filogenético realizado con inferencia Bayesiana analizando los datos del *trnH - psbA* IGS. Valores de robustez de probabilidad a posteriori (PP) situados encima de las ramas. N° de generaciones = 1.500.000; *thin* = 100; *burnin* = 3.000. En rojo partes conflictivas (ver apartado 3.3.7.2).

Los árboles obtenidos a partir de los datos de las secuencias de cpDNA han presentado la misma topología que los dos anteriores aunque con alguna diferencia en la posición de algunas taxa dentro de los clados principales (Fig. 3.14). Por ejemplo, dentro del Clado 1B, las taxa *A. ciliolatum*, *A. circinatum* y *A. villosum* aparecen con *A. burchelli* y al mismo nivel que *A. irroratum*, *A. albanense* subsp. *clanwilliamense* y *A. hantamense*, mientras que en los árboles obtenidos a partir del análisis de los datos de las cinco secuencias de DNA, estas taxa aparecen basales en relación a los anteriores. También es remarcable la presencia en el Clado 2 de *A. cuspidatum* con *A. melanthioides* mientras que en el árbol anteriormente descrito aparece junto a *A. dregei* y las especies de los géneros *Bulbocodium*, *Colchicum* y *Merenera*.

El árbol obtenido a partir de los datos de las secuencias de nDNA ha presentado muy poca resolución, al igual como se ha observado analizando estos mismos datos con máxima parsimonia (Fig. 3.15). El árbol muestra una gran politomía donde solo se observan dos clados formados por (i) las especies del norte de África, *A. roseum*, *A. asteroides* y, curiosamente, *A. henssenianum* y (ii) algunas especies que forman el Clado 1B en los anteriores árboles. Resulta también curiosa la presencia de *A. cuspidatum* en posición basal.

Los árboles generados a partir del análisis de cada una de las secuencias mostraron muy poca resolución, dado los pocos caracteres filogenéticamente informativos con los que cuenta cada uno de los conjuntos de datos de forma independiente.

3.3.5.2.3 Parámetros estimados a priori

Los árboles realizados a partir del análisis de los datos de las cinco regiones secuenciadas y estimando a priori los valores de los parámetros del modelo evolutivo de sustitución nucleotídica, presentaron la misma topología que los realizados estimando los parámetros evolutivos a posteriori. La única diferencia se encuentra en los valores de probabilidad a posteriori que soportan los nodos de las ramas del árbol, que en algunos casos son más elevados (Fig. 3.17).

3.3.6 Combinabilidad de los datos

3.3.6.1 ANÁLISIS CONJUNTOS

Para analizar la filogenia se combinaron los datos de las secuencias de cuatro regiones cloroplásticas (*trnL* intrón, *trnL-trnF* IGS, *trnY-trnD* IGS, *trnH-psbA* IGS) y de una región nuclear (*RNApol2_i23*). Como resultado de combinar estas cinco regiones, se obtuvo una matriz de 2877 pb, siendo el porcentaje de variabilidad total del 25,4% (Tabla 3.4). Los 161 indels que fue necesario insertar para alinear las secuencias, fueron codificados como caracteres binarios para ser utilizados en la filogenia (Simmons & Ochoterena 2000). Debido a esta codificación, se obtuvo una matriz final de 3038 caracteres, siendo 161 caracteres los indels codificados como 0 y 1 (Tabla 3.5).

3.3.6.2 TEST ILD

En el análisis conjunto de los datos de las cinco regiones secuenciadas, el test ILD dio un resultado significativo ($p = 0,01$), indicando así la dificultad de realizar un análisis filogenético utilizando conjuntamente las secuencias de las cinco regiones. Cuando se excluyó de este análisis el gen nuclear y se analizó únicamente el genoma cloroplástico, este test también dio un resultado significativo ($p = 0,01$). Comprobamos también diferentes combinaciones entre las regiones secuenciadas (Tabla 3.7) obteniéndose únicamente un resultado no significativo ($p = 0,27$) cuando se testó la combinabilidad de las secuencias de las regiones *trnL* intrón y *trnL-trnF* IGS debido seguramente a que son dos regiones contiguas dentro de la molécula de DNA cloroplástico (Fig. 3.4).

Tabla 3.7: resultados del test ILD al realizar diferentes combinaciones de datos de las secuencias.

REGIÓN	p
<i>trnL</i> intrón + <i>trnL-trnF</i> IGS + <i>trnY-trnD</i> IGS + <i>trnH-psbA</i> IGS + <i>RNApol2_i23</i>	0,01
cpDNA (<i>trnL</i> intrón + <i>trnL-trnF</i> IGS + <i>trnY-trnD</i> IGS + <i>trnH-psbA</i> IGS)	0,01
<i>trnL</i> intrón + <i>trnL-trnF</i> IGS + <i>trnH-psbA</i> IGS + <i>RNApol2_i23</i>	0,01
<i>trnL</i> intrón + <i>trnL-trnF</i> IGS + <i>trnH-psbA</i> IGS	0,01
<i>trnH-psbA</i> IGS + <i>RNApol2_i23</i>	0,01
<i>trnL</i> intrón + <i>trnL-trnF</i> IGS	0,27

Se realizaron 100 repeticiones con 500 árboles por repetición y partición

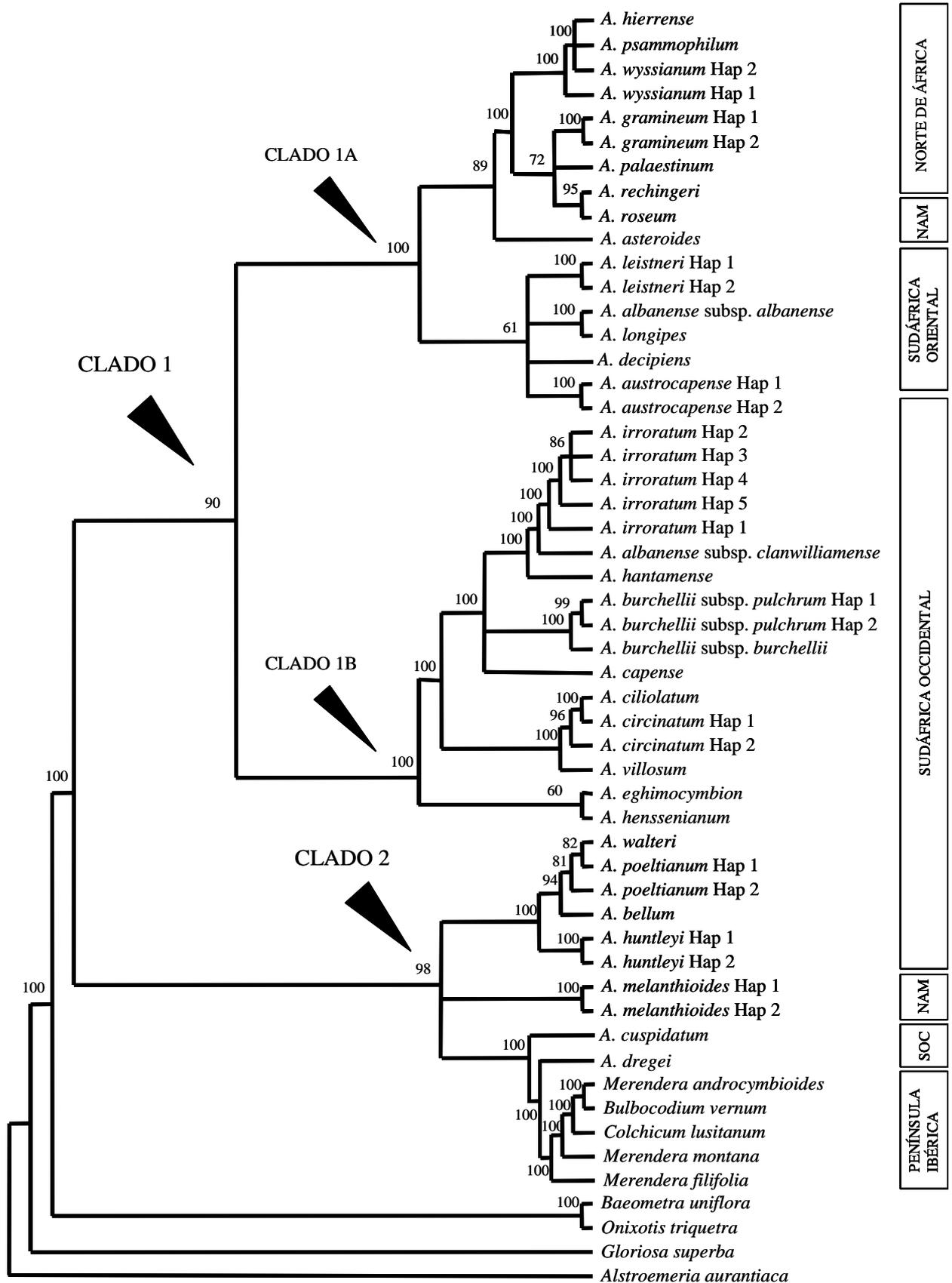


Fig. 3.17a: árbol filogenético realizado con inferencia Bayesiana analizando todos los datos de forma conjunta. Parámetros evolutivos determinados de forma a priori (ver Tabla 3.4) Valores de robustez de probabilidad a posteriori (PP) situados encima de las ramas. N° de generaciones = 1.000.000; *thin* = 100; *burnin* = 2.000. NAM: Namibia; SOC: Sudáfrica occidental.

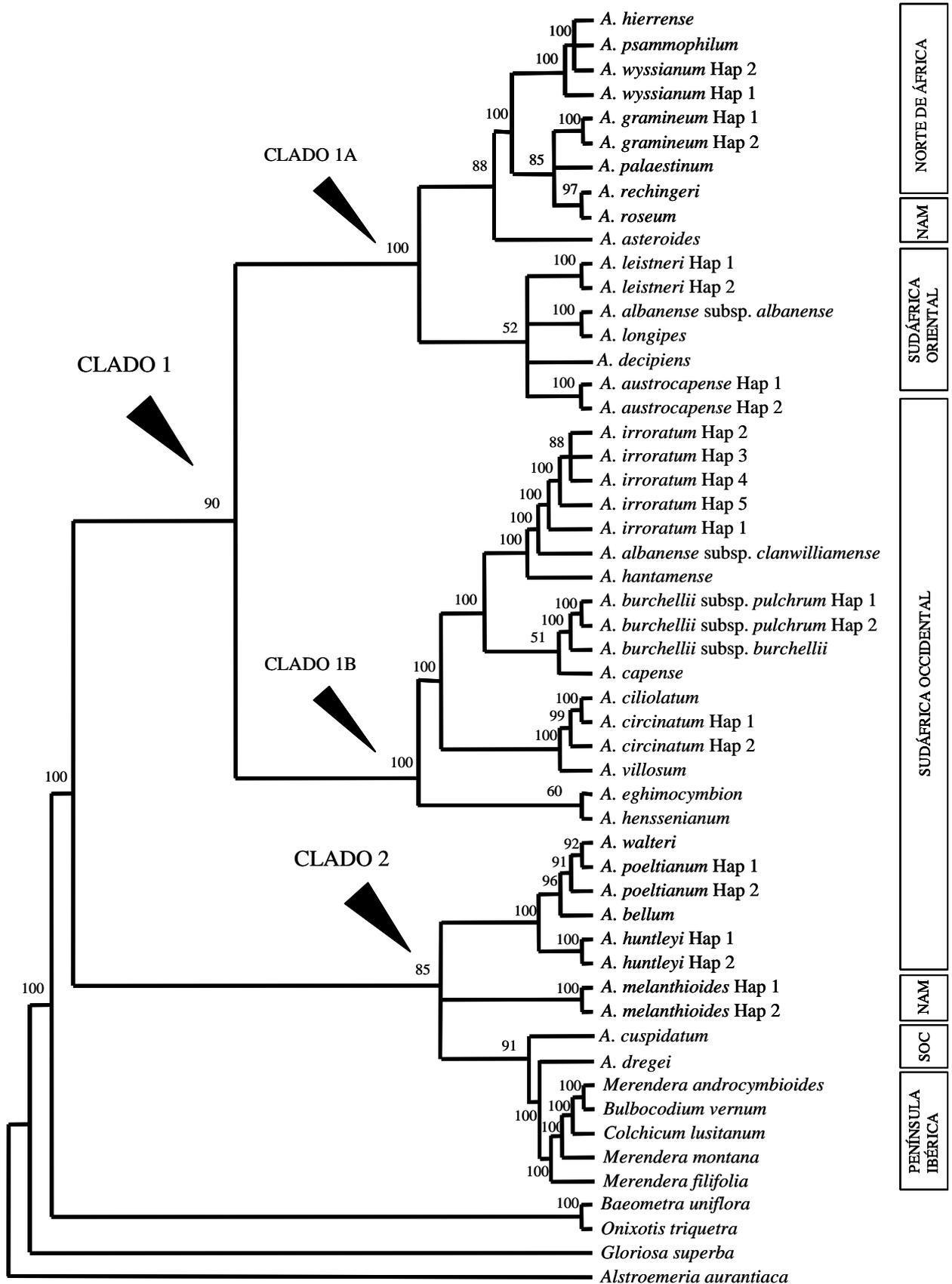


Fig. 3.17b: árbol filogenético realizado con inferencia Bayesiana analizando cada uno de los conjuntos de datos por separado. Parámetros evolutivos determinados de forma a priori (ver Tabla 3.4) Valores de robustez de probabilidad a posteriori (PP) situados encima de las ramas. N° de generaciones = 1.000.000; *thin* = 100; *burnin* = 2.000. NAM: Namibia; SOC: Sudáfrica occidental.

3.3.6.2 MÉTODO DE WIENS

Utilizando este método, solo en algunos casos se observaron “partes conflictivas” entre los árboles de inferencia Bayesiana obtenidos para cada uno de los genes por separado y el árbol realizado con los datos de las cinco regiones secuenciadas, observándose una mejor resolución en este último (Tabla 3.8; Fig. 3.15 y 3.16).

3.3.6.3 COMPARACIÓN DE ÁRBOLES: TEST SHIMODAIRA-HASEGAWA

Dado que el método descrito por Wiens (1998) puede resultar bastante subjetivo a la hora de comparar las filogenias, se utilizó el test de Shimodaira-Hasegawa (1999) para comparar los árboles de cada conjunto de datos utilizando los parámetros y el modelo evolutivo definidos por el LRT con el programa Modeltest (Posada & Crandal 1998) (Tabla 3.4). Al comparar los cinco árboles obtenidos con cada conjunto de datos, se obtuvo una diferencia no significativa ($p = 0,787$) entre la probabilidad de los árboles realizados a partir de las secuencias del *trnL* intrón y del *trnL-trnF* IGS. Los tres árboles restantes resultaron ser significativamente diferentes en relación a estos dos (Tabla 3.9). Al comparar los tres árboles restantes, se obtuvo una diferencia no significativa ($p = 0,303$) entre las probabilidades de los árboles obtenidos con las secuencias del *trnH-psbA* IGS y la *RNApol2_i23*. El árbol obtenido con las secuencias del *trnY-trnD* IGS obtuvo un valor de probabilidad significativamente diferente del resto (Tabla 3.9). Cuando se realizó esta misma comparación pero incluyendo también el árbol realizado a partir del análisis de las secuencias de las cinco regiones de forma conjunta, los valores de probabilidad de los árboles realizados a partir de cada una de las regiones por separado, resultaron ser significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Tabla 3.9).

Tabla 3.8: partes conflictivas según Wiens (1998) entre el árbol filogenético realizado a partir de los datos de las cinco regiones secuenciadas y los árboles realizados a partir de cada una de las regiones de forma individual.

ÁRBOL	PARTES CONFLICTIVAS
<i>trnL</i> intrón	ninguna
<i>trnL-trnF</i> IGS	<i>A. melanthioides</i> basal a especies del Clado 1 <i>A. capense</i> con <i>A. ciliolatum</i> , <i>A. circinatum</i> y <i>A. villosum</i> <i>A. hantamense</i> no aparece con <i>A. irroratum</i> y <i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i> <i>A. cuspidatum</i> no aparecen con <i>A. dregei</i> y especies outgroup de la tribu <i>Colchiceae</i> <i>A. eghimocymbion</i> aparece en posición basal en el ingroup <i>Colchiceae</i> y no con clado 2
<i>trnY-trnD</i> IGS	<i>A. melanthioides</i> Hap. 1 y <i>A. rechingeri</i> con dos especies de Sudáfrica oriental y <i>A. roseum</i> <i>A. melanthioides</i> Hap. 1 separado de <i>A. melanthioides</i> Hap. 2 <i>Baeometra uniflora</i> , <i>Gloriosa superba</i> y <i>Onixotis stricta</i> dentro del ingroup <i>Colchiceae</i>
<i>trnH-psbA</i> IGS	<i>A. huntleyi</i> Hap. 1 separada de <i>A. huntleyi</i> Hap. 2 y en posición basal del ingroup <i>Colchicaceae</i> <i>A. henssenianum</i> en posición basal del ingroup <i>Colchiceae</i> <i>A. irroratum</i> Hap. 1 separada del resto de haplotipos de <i>A. irroratum</i> y en posición basal del ingroup <i>Colchiceae</i>
<i>RNApol2_i23</i>	<i>A. henssenianum</i> dentro del Clado 1A <i>A. cuspidatum</i> en posición basal dentro de la familia <i>Colchicaceae</i> <i>Gloriosa superba</i> aparece con <i>A. ciliolatum</i> y <i>A. circinatum</i>

También se compararon con esta metodología los cuatro árboles obtenidos con inferencia Bayesiana a partir del análisis de los datos de las cinco regiones secuenciadas (dos estimando los parámetros del modelo evolutivo a posteriori y otros dos a priori), obteniéndose probabilidades no significativamente diferentes (Tabla 3.10a). También se compararon los árboles de inferencia Bayesiana obtenidos a partir de la estimación de los valores de los parámetros del modelo evolutivo de sustitución nucleotídica a posteriori con los dos árboles obtenidos con máxima parsimonia (5 regiones y cpDNA) y, aunque presentan topologías similares, los valores de probabilidad calculados con el test de Shimodaira-Hasegawa (Shimodaira & Hasegawa 1999) resultaron ser significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre los árboles realizados con las secuencias de cpDNA y los realizados utilizando las secuencias de las cinco regiones secuenciadas (Tabla 3.10b). Dado que no existen diferencias topológicas significativas entre los árboles obtenidos con los diferentes modos de análisis utilizando inferencia Bayesiana (Tabla 3.10a), y que el árbol que

queda mejor resuelto es el que se ha realizado con inferencia Bayesiana utilizando los datos de las cinco regiones secuenciadas (Tabla 3.10b), la discusión se realizará en base a estos últimos árboles.

Tabla 3.9: test Shimodaira-Hasegawa entre los árboles generados a partir del análisis de cada una de las regiones secuenciadas.

Árbol	Probabilidad*	Diferencia Probabilidad	p
<i>trn</i> L intrón	9292,74	14,35	0,787
<i>trn</i> L- <i>trn</i> F IGS	9278,39	(mejor)	
<i>trn</i> Y- <i>trn</i> D IGS	9820,68	542,29	0,000
<i>trn</i> H- <i>psb</i> A IGS	9534,33	255,94	0,006
<i>RNApol2</i> _i23	9618,36	339,97	0,002

Árbol	Probabilidad*	Diferencia Probabilidad	p
<i>trn</i> Y- <i>trn</i> D IGS	9820,68	286,35	0,004
<i>trn</i> H- <i>psb</i> A IGS	9534,33	(mejor)	
<i>RNApol2</i> _i23	9618,36	84,03	0,303

Árbol	Probabilidad*	Diferencia Probabilidad	p
<i>trn</i> L intrón	9292,74	227,62	0,012
<i>trn</i> L- <i>trn</i> F IGS	9278,39	213,27	0,015
<i>trn</i> Y- <i>trn</i> D IGS	9820,68	755,56	0,000
<i>trn</i> H- <i>psb</i> A IGS	9534,33	469,21	0,000
<i>RNApol2</i> _i23	9618,36	553,24	0,000
Combinado	9065,12	(mejor)	

* -ln L

Tabla 3.10a: test Shimodaira-Hasegawa entre los árboles realizados con inferencia Bayesiana a partir de los todos de las cinco regiones secuenciadas.

Árbol	Probabilidad*	Diferencia	p
MrBayes datos separados + parámetros a posteriori	9066,76	0,89	0,28
MrBayes datos conjuntos + parámetros a posteriori	9066,76	0,89	0,28
MrBayes datos separados + parámetros a priori	9065,87	(mejor)	
MrBayes dates conjuntos + parámetros a priori	9065,87	0,00	0,79

*-lnL

Tabla 3.10b: test Shimodaira-Hasegawa entre los diferentes árboles obtenidos con máxima parsimonia e inferencia Bayesiana.

Árbol	Probabilidad*	Diferencia	p
MP: datos cinco regiones secuenciadas	9109,95	43,19	0,067
MP: datos secuencias cpDNA	9183,81	117,05	0,000
MrB: datos cinco regiones analizadas conjuntamente	9066,76	mejor	
MrB: datos cinco regiones analizadas de forma separada	9066,76	0,00	1,000
MrB: datos secuencias cpDNA analizadas conjuntamente	9117,00	50,24	0,013
MrB: datos secuencias cpDNA analizadas de forma separada	9121,75	54,99	0,007

* -lnL; MP: máxima parsimonia; MrB: inferencia Bayesiana

Valores de probabilidad con inferencia Bayesiana estimados a posteriori

3.3.7 Análisis biogeográfico

El análisis de ancestralidad de Bremer (1992) sugiere que la región mas probable de origen del género es Sudáfrica occidental (Tabla 3.11; Fig. 3.18 y 3.19), ya que en ambos análisis (árbol MP e inferencia Bayesiana) es la que presenta un valor mas elevado en la relación ganancias/perdidas de área. La segunda región mas probable es Sudáfrica oriental seguida por el Norte de África e Islas Canarias.

Con el método de Ronquist (1997) se obtuvo un cladograma de áreas donde en posición basal también se encuentran las áreas de Sudáfrica occidental y Namibia (Fig 3.20).

Tabla 3.11: tabla de ganancias y perdidas de áreas según el método de Bremer (1992) a partir del análisis de los árboles obtenidos con inferencia Bayesiana y máxima parsimonia

Árbol de máxima parsimonia

Área	Ganancias	Pérdidas	G / P	V. R.
Norte de África - Islas Canarias	4	11	0,36	0,43
Sudáfrica occidental	5	6	0,83	1,00
Sudáfrica oriental	4	7	0,57	0,69
Namibia	3	12	0,25	0,30

Árbol de inferencia Bayesiana

Área	Ganancias	Pérdidas	G / P	V. R.
Norte de África - Islas Canarias	4	5	0,80	0,60
Sudáfrica occidental	4	3	1,30	1,00
Sudáfrica oriental	4	4	1,00	0,75
Namibia	3	8	0,38	0,28

G: ganancias; P: pérdidas; V. R.: valor reescalado de G / P.

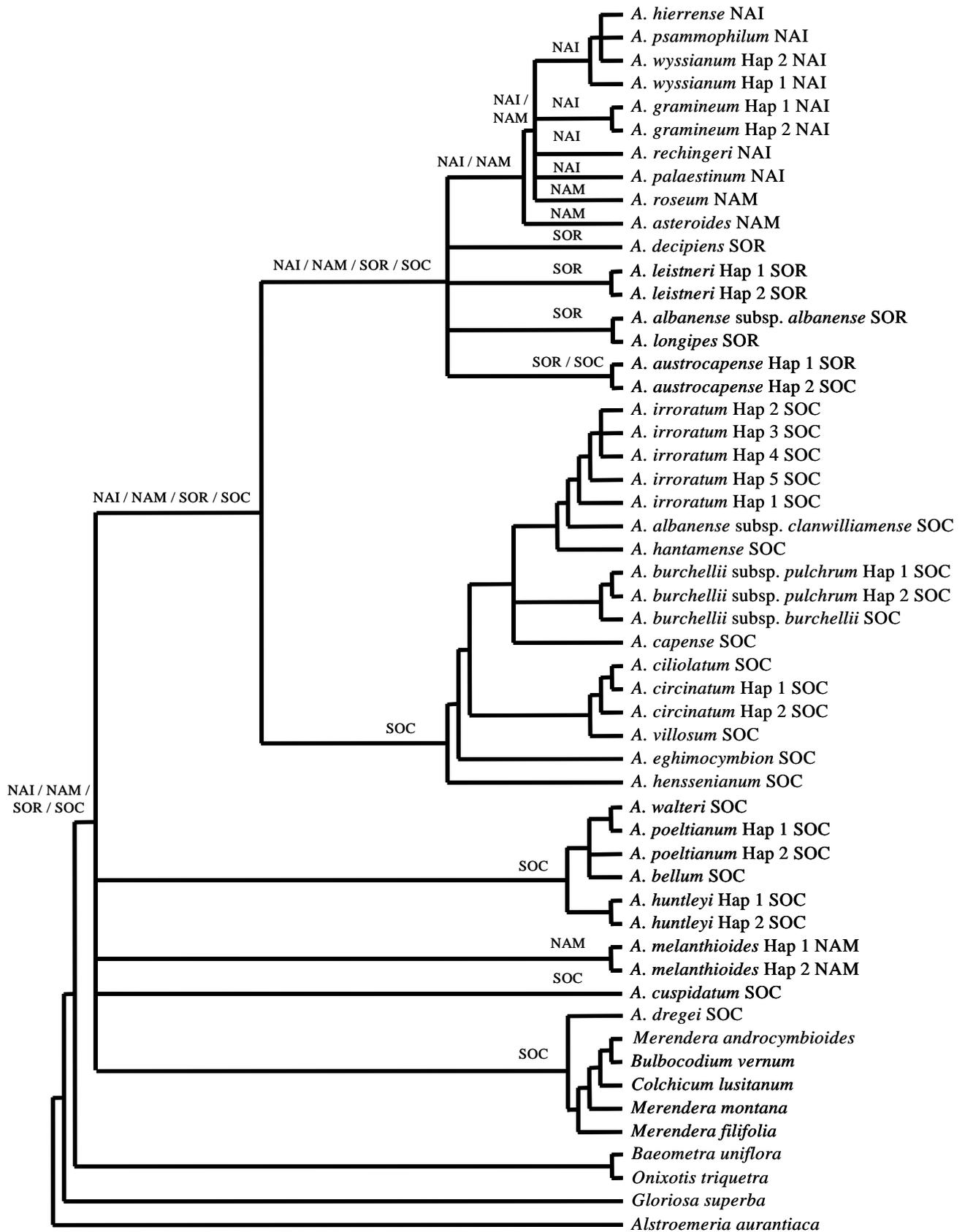
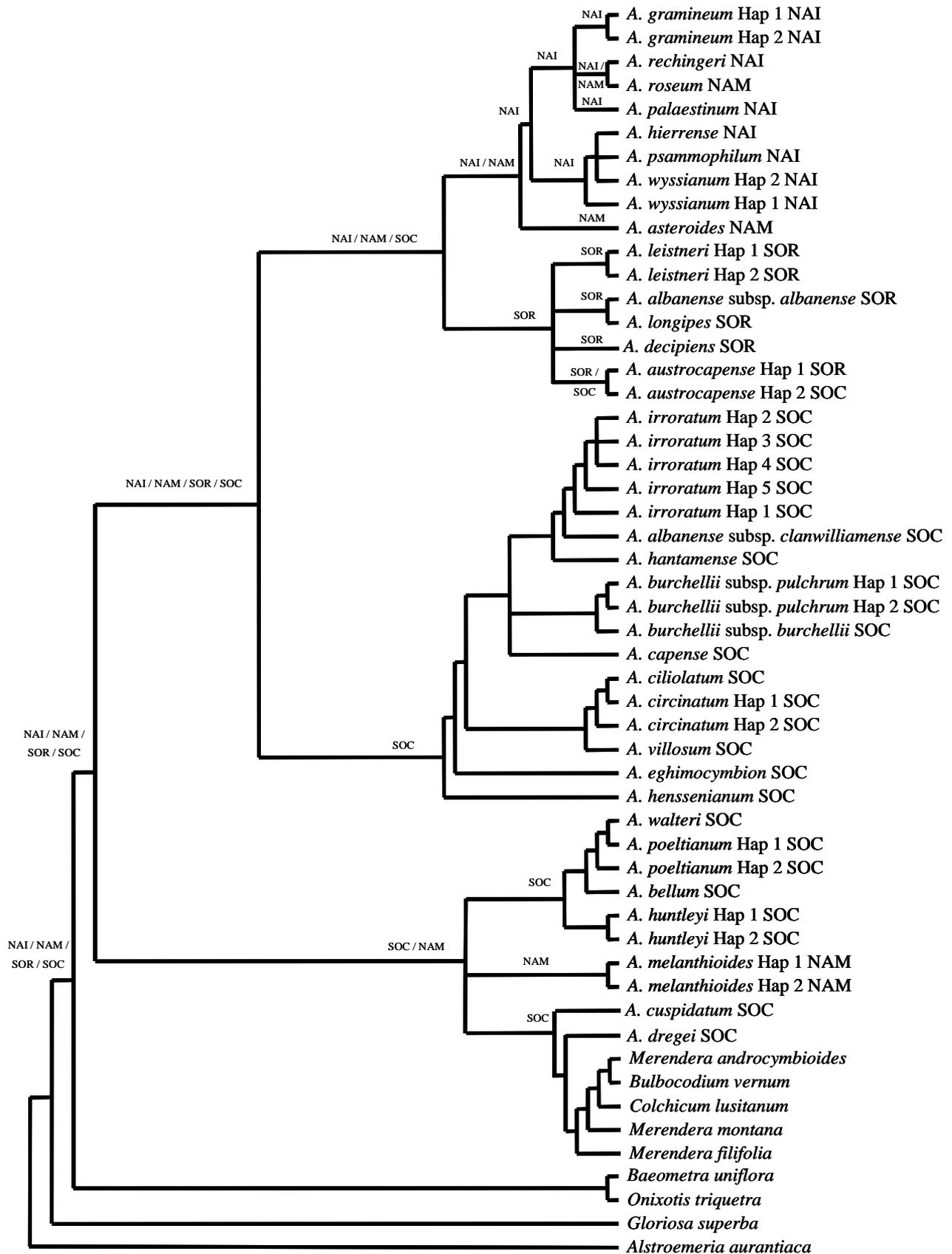


Fig. 3.18: árbol filogenético de máxima parsimonia con áreas de distribución de las especies. NAI: Norte de África – Islas Canarias; NAM: Namibia; SOR: Sudáfrica oriental; SOC: Sudáfrica occidental.



3.3.8 Reloj Molecular

Para datar los diferentes eventos evolutivos del género *Androcymbium* con PAML/Multidivtime, los datos de las cinco regiones secuenciadas fueron analizados de forma conjunta. Aunque el programa permite analizar cada conjunto de datos de forma separada y luego puede utilizar estos resultados para realizar una única datación, se analizaron de forma conjunta debido a que no se han visto diferencias topológicas significativas entre los árboles realizados con los datos de las cinco regiones secuenciadas analizados de forma conjunta o por separado con métodos estadísticos Bayesianos (Tabla 3.10). Utilizando esta metodología, hemos obtenido un valor de tiempo para cada nodo del árbol (en millones de años: ma.), así como su desviación estándar y su intervalo de confianza del 95% (Tabla 3.12). Se dataron aquellos nodos del árbol 3.13 de inferencia Bayesiana con valores de $PP \geq 50$ y se colapsaron aquellos que presentaron valores de PP inferiores, creándose politomias.

El origen del género *Androcymbium* se ha datado en $11,2 \pm 2$ ma. (Fig. 3.21 nodo a), que corresponde a los inicios del Mioceno inferior. El origen del ancestro de las especies que forman el Clado 1 se ha datado en $10,3 \pm 2$ ma., mientras que el ancestro de las especies que forman el Clado 2 se ha datado en $10,2 \pm 2$ ma. (Fig. 3.21 nodos b y c). La separación de los géneros *Bulbocodium*, *Colchicum* y *Merendera* del género *Androcymbium* se ha datado en $7,2 \pm 2,5$ ma (Fig.3.21 nodo e). El ancestro común de las especies que forman el Clado 1A se ha datado en $6,0 \pm 2$ ma., mientras que el ancestro común de las especies de Sudáfrica occidental que forman el Clado 1B se ha datado en $9,0 \pm 2$ ma. (Fig.3.21 nodos d y f). El ancestro de las especies de Sudáfrica oriental se ha datado en $4,8 \pm 2$ ma., y el ancestro de las especies del Norte de África e Islas Canarias en $3,2 \pm 2$ ma. (Fig.3.21 nodos g y h).

La mayor parte de los procesos de especiación ocurridos en Sudáfrica occidental se han datado a finales del Mioceno ($11,0 - 5,3$ ma.). Los procesos de especiación que afectan a las especies de Sudáfrica oriental y Norte de África – Islas Canarias se han datado en periodos mas recientes, sobretodo durante el Plioceno ($5,3 - 1,8$ ma.).

Tabla 3.12: datación de los nodos del árbol filogenético con PAML / Multidivtime.

NODO	TIEMPO	Dev. St.	I.C. 95%
52	1,38	0,90	0,11 - 3,56
53	1,24	0,81	0,10 - 3,21
54	2,51	1,06	0,83 - 4,92
55	1,84	0,97	0,39 - 4,11
56	2,74	1,10	0,95 - 5,21
57	3,32	1,19	1,31 - 5,89
58	4,49	1,26	2,14 - 6,95
59	1,29	0,97	0,06 - 3,67
60	0,95	0,81	0,03 - 3,04
61	2,00	1,28	0,14 - 4,97
62	4,75	1,30	2,23 - 7,15
63	5,96	1,25	3,30 - 7,88
64	1,83	1,06	0,19 - 4,27
65	3,36	1,27	1,06 - 5,91
66	4,35	1,27	1,93 - 6,76
67	0,98	0,82	0,04 - 3,09
68	1,79	1,08	0,28 - 4,32
69	0,97	0,66	0,13 - 2,66
70	2,10	1,01	0,51 - 4,35
71	3,38	1,03	1,53 - 5,51
72	4,09	1,05	2,12 - 6,15
73	4,79	1,06	2,69 - 6,74
74	5,42	1,05	3,24 - 7,22
75	6,36	0,95	4,18 - 7,64
76	7,91	1,18	5,48 - 10,18
77	9,06	1,20	6,62 - 11,30
78	10,32	1,14	7,94 - 12,27
79	2,34	0,96	0,84 - 4,56
80	3,43	1,13	1,58 - 5,95
81	4,30	1,25	2,17 - 7,01
82	5,60	1,33	3,24 - 8,34
83	7,23	1,41	4,62 - 10,05
84	8,21	1,38	5,60 - 10,94
85	2,91	1,35	0,55 - 5,88
86	4,16	1,39	1,74 - 7,12
87	5,21	1,41	2,66 - 8,11
88	3,98	1,63	1,06 - 7,46
89	7,32	1,44	4,56 - 10,13
90	1,35	0,98	0,15 - 3,91
91	10,20	1,27	7,68 - 12,56
92	11,21	1,17	8,83 - 13,35
93	14,38	0,75	13,53 - 16,27
94	16,07	0,99	14,34 - 18,34
95	17,09	0,94	16,04 - 19,51

Tiempo expresado en millones de años (ma); Dev.St: desviación estándar; I.C. 95%: intervalo de confianza del 95%.

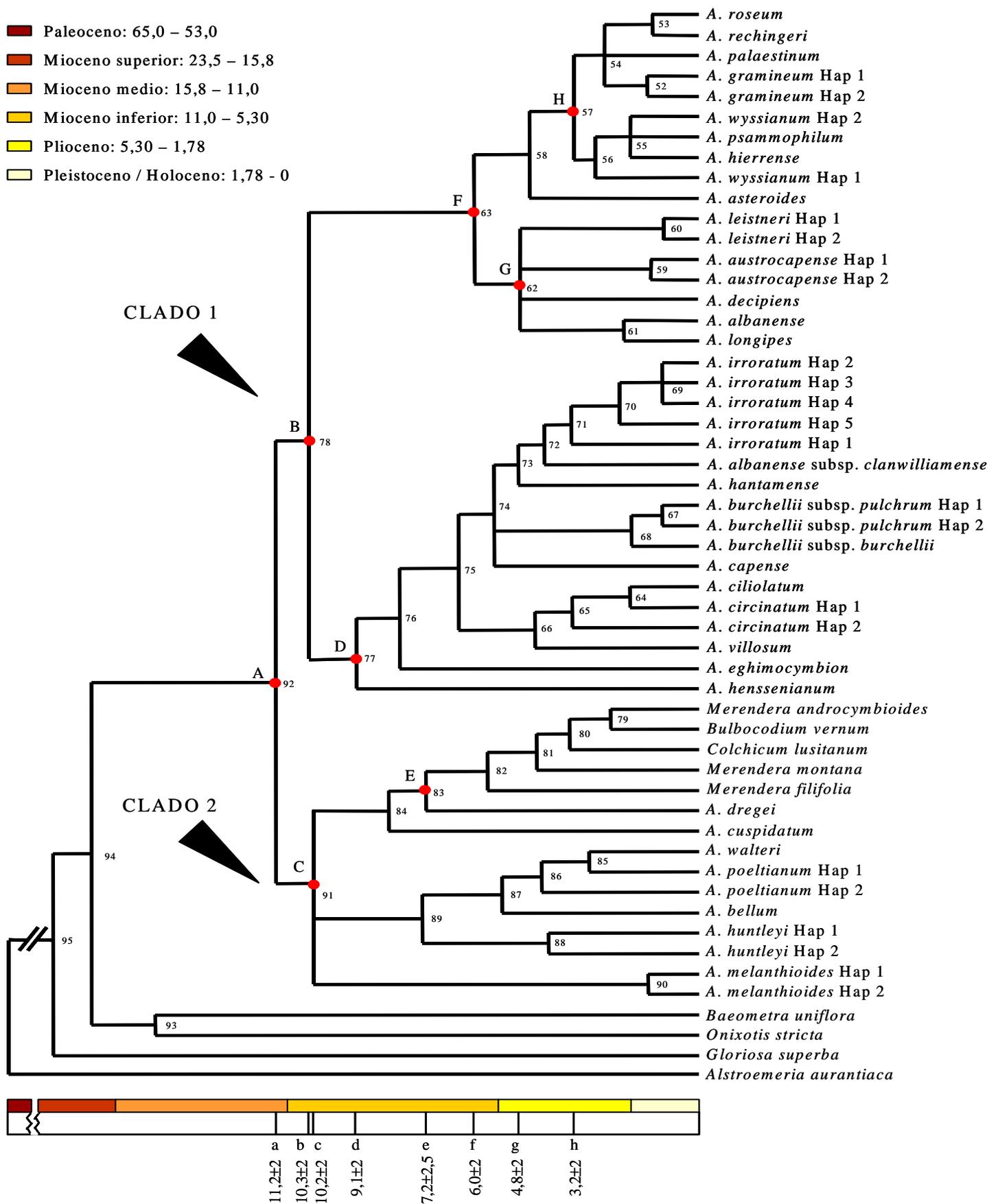


Fig. 3.21: cronograma del género *Androcymbium*. Tiempo en millones de años. Datación de cada uno de los nodos en la tabla 3.12.

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 Taxonomía

La primera conclusión que se deduce del árbol filogenético obtenido es que las especies asignadas actualmente al género *Androcymbium* no constituyen un grupo monofilético, ya que algunas especies de este género aparecen conjuntamente con especies de los géneros *Bulbocodium*, *Colchicum* y *Merendera* (Fig. 3.13). Para conseguir que el género *Androcymbium* sea monofilético, se necesitan 23 pasos más en el árbol de máxima parsimonia (Fig. 3.22), aunque si lo hacemos sin incluir a los taxa *A. dregei* y *A. cuspidatum*, solo son necesarios 12 pasos más (Fig. 3.23). Según Dahlgren et al. (1985), estos cuatro géneros forman la tribu *Colchiceae*, y se caracterizan morfológicamente por poseer bulbos subterráneos tunicados como un cormo y por tener las flores situadas en el centro del brote. Las flores frecuentemente se desarrollan antes que las hojas verdes (histerantia), con nectarios androécicos situados en la base de los filamentos. Los tépalos son largos y unguados, y estos pueden estar libres o fusionados a lo largo de un tubo. Las anteras son latrorsas. Los granos de polen son bi-, tri-, o tetraporados. Contienen tres estilodios que pueden ser libres o fusionados basalmente en un único estilo. El pistilo da lugar a una capsula septicida. Muchos autores contemporáneos, basándose en inconspicuos caracteres morfológicos, han incluido recientemente estos tres géneros dentro de *Colchicum* (Dahlgren et al. 1985; Persson 1993; Nordenstam 1998).

Esta definición de Dahlgren et al. (1985) sobre la tribu *Colchiceae* es muy generalista. La histerantia¹ propia del género *Colchicum* (incluyendo *Bulbocodium* y *Merendera*) sobre la que hablan estos autores para su caracterización, no es del todo cierta, ya que dentro de este género hay especies sinantás² (Persson 1993; Akan & Eker 2005). La latrorsidad de las anteras no se puede generalizar para toda la tribu, ya que en nuestras observaciones de *Androcymbium*, *Merendera* (*M. androcymbioides*) y en ciertas especies de *Colchicum*, encontramos anteras extrorsas, introrsas y latrorsas, ampliando así la información descriptiva y definitoria de la tribu.

¹ Desarrollo de las hojas después de la floración

² Emergencia simultánea de las hojas y las flores



Fig.3.22: árbol de máxima parsimonia con el género *Androcymbium* monofilético. N° pasos = 1124; CI = 0.719; RI = 0.745. Se han necesitado 23 pasos mas que en el árbol original (Fig. 3.10).



Fig.3.23: árbol de máxima parsimonia con el género *Androcymbium* monofilético sin incluir a los taxa *A. cuspidatum* y *A. dregei*. N° pasos = 1113; CI = 0.726; RI = 0.754. Se han necesitado 12 pasos mas que en el árbol original (Fig. 3.10).

Estas generalidades definitorias de la tribu *Colchiceae* se han basado fundamentalmente en una muestra pequeña de especies sin tener en cuenta al género *Androcymbium*, el cual presenta algunas características morfológicas que le separa de alguno de ellos. Todos estos errores en la definición de estos géneros de la tribu *Colchiceae*, se han ido arrastrando en numerosos trabajos posteriores. Por ejemplo, se dice que *Bulbocodium*, *Colchicum* y *Merendera*, se caracterizan por poseer un hábito acaulescente y por tener el ovario oculto encima del cormo, en la parte subterránea del perigonio, creciendo hasta la superficie cuando madura (Dahlgren et al. 1985), y que todas las especies del género *Androcymbium* son, generalmente, caulescentes. Pero realmente en algunas especies de *Colchicum* (*C. cupani*,) y *Merendera* (*M. montana* y *M. androcymbioides*) es difícil hacer tal separación. Incluso para *Androcymbium*, ya que *A. exiguum* subsp. *vogelii* presenta un crecimiento del tallo capsular después de su maduración que se asemeja de sobremanera a p.e. *C. autumnale*. Por tanto dudamos de la asignación a estas diferencias de “hábito a/caulescente” como autapomorfias de esta tribu.

Los géneros *Androcymbium*, *Bulbocodium* y *Merendera* se asemejan en que presentan los tépalos unglados libres, no fusionados, mientras que en *Colchicum* estos se fusionan a lo largo de un tubo tepalar. En *Bulbocodium*, los estilos de los tres carpelos se fusionan en un punto a cierta altura para luego dividirse en tres estiloides, mientras que en los otros géneros los tres estilos están separados.

Hasta la fecha, la diferenciación entre estos cuatro géneros se había basado en estas características morfológicas, aunque hemos visto que sus dudas iban aumentando recientemente conforme se iba ampliando el conocimiento de más especies de estos géneros. El problema se evidencia claramente con la utilización de análisis moleculares para estudios taxonómicos. En base a nuestros datos moleculares, se ha obtenido una fuerte y poderosa evidencia de que el género *Androcymbium* no es monofilético, dada la presencia de especies del género *Androcymbium* conjuntamente con especies de los géneros *Bulbocodium*, *Colchicum* y *Merendera*, y soportada esta agrupación por elevados valores de probabilidad a posteriori (PP = 77% y PP = 89%; Fig. 3.13). Esto mismo se ha observado en un trabajo

con toda la familia *Colchicaceae* y soportado por un elevado valor bootstrap (BS = 95%) (Vinnersten & Reeves 2003) (Fig. 3.24).

Según la *Angiosperm Phylogeny Group* (APG 1998, 2003) y Backlund & Bremer (1998), las clasificaciones filogenéticas deben de estar basadas en diversos criterios y el más importante es el de la monofilia. Los siguientes criterios en importancia son la estabilidad del taxón, la estabilidad de la nomenclatura, la maximización de la información filogenética y el fácil reconocimiento del grupo. En nuestro estudio, las especies de los géneros *Bulbocodium*, *Colchicum* y *Merendera*, juntamente con algunas especies del género *Androcymbium*, forman un clado fuertemente soportado. Para conseguir que el género *Androcymbium* sea monofilético, se necesitan 25 pasos más (Fig. 3.22), lo cual es una fuerte evidencia de que la actual clasificación de las especies de *Androcymbium* nos produce un género que no sería monofilético. Por ello, basándonos en los datos moleculares de este estudio, se podría proponer una nueva clasificación en dos géneros: (i) género *Androcymbium*, formado por las especies que forman el Clado 1; (ii) género *Colchicum*, formado por las especies que forman el Clado 2. Esta clasificación también se puede deducir del árbol de Vinnersten & Reeves (2003) en el que la primera agrupación recibe un soporte BS = 100% y la segunda un BS = 95% (Fig. 3.24). Mediante esta nueva clasificación se mantendría el criterio de la monofilia de género, la estabilidad del taxón, la estabilidad de la nomenclatura y la maximización de la información filogenética. La distinción morfológica entre las actuales especies de *Androcymbium* del clado 2 y las especies del clado 1, se encuentra en el cormo (Fig. 3.25). En las especies de *Androcymbium* del Clado 2, este suele presentar estrías longitudinales en la superficie y falda en posición basal, con una división vegetativa del cormo tipo C (Fig. 1.1; pag.35). En las especies del Clado 1, el cormo tiene la superficie sin estrías, no presenta una falda tan aparente y la división vegetativa es del tipo A o C (Fig. 1.1; pag. 35). A pesar de las dudas por la difícil identificación de esta característica subterránea, que no siempre es tan evidente para todas las especies de este Clado 2, este podría ser un carácter a utilizar como medida transitoria de prudencia nomenclatural hasta que nuevas evidencias aclaren estas circunscripciones taxonómicas.

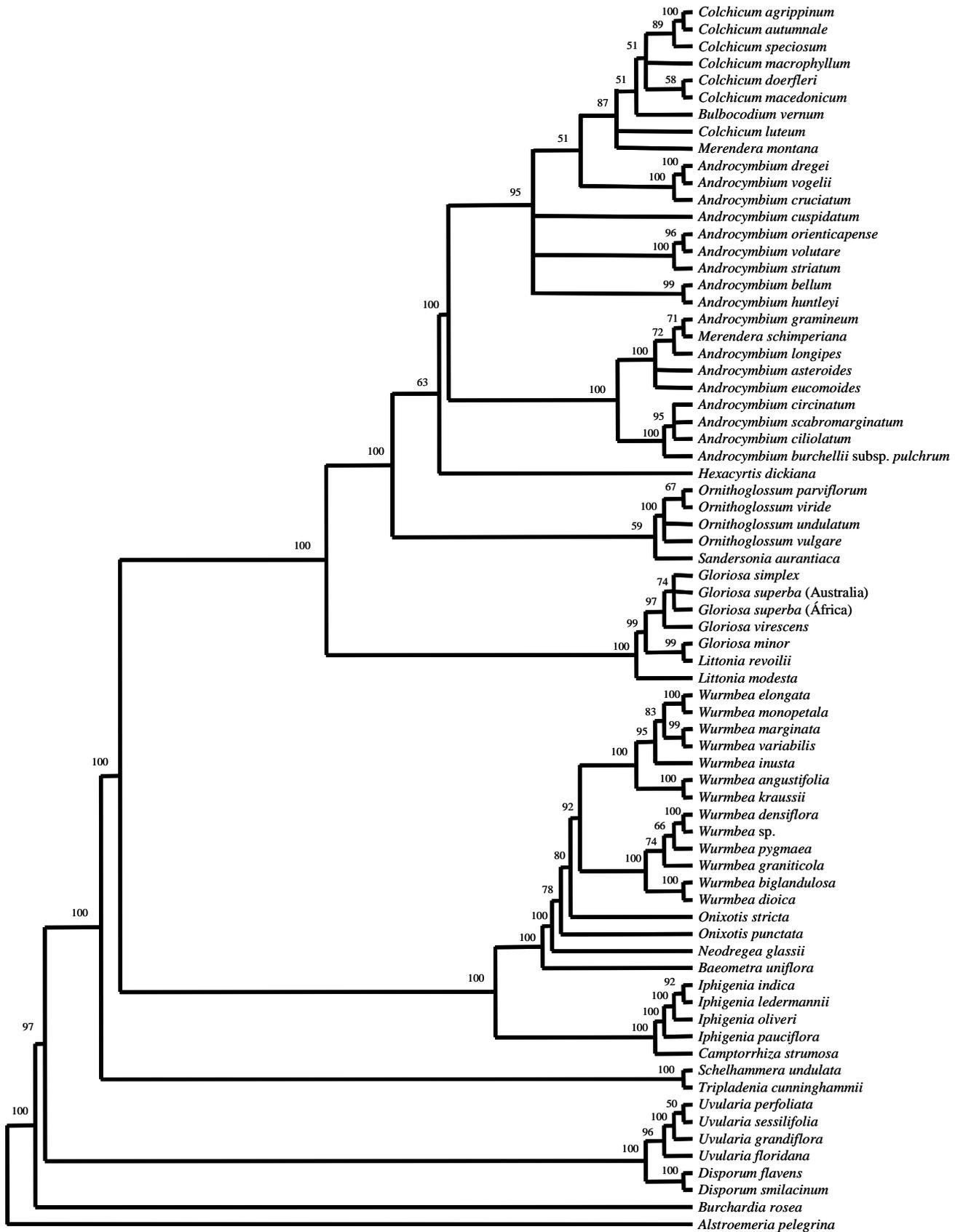


Fig. 3.24: árbol filogenético de la familia Colchicaceae realizado con máxima parsimonia del artículo de Vinnersten & Reeves (2003). N° pasos = 2082; CI = 0.74; RI = 0.85.

Lo que parece claro y evidente con los datos recientes y con los propios obtenidos en estos análisis filogenéticos, es que los géneros *Bulbocodium* y *Merendera* deberían incluirse en el género *Colchicum*, tal y como proponen Dalhgren et al. (1985) y Persson (en prep). En el trabajo de Vinnersten & Reeves (2003) los géneros *Bulbocodium*, *Colchicum* y *Merendera*, forman un clado bastante bien soportado (BS = 87%) al igual que en nuestro trabajo (PP = 100%), mientras que la posición de las especies de *Androcymbium* no queda muy bien definida (Fig. 3.24).

Esta nueva clasificación en dos géneros debe ser tomada con mucha cautela dada la ausencia de claros caracteres morfológicos distintivos entre las especies de estos dos géneros redefinidos y que solo se han analizado cinco especies del género *Colchicum*. Por ello, sería conveniente realizar futuros trabajos contando con un mayor número de especies del género *Colchicum*, dado que ello podría ayudar a esclarecer mejor estas relaciones filogenéticas tal y como proponen Zwickl & Hillis (2002). Por tanto, el resto de la discusión se va a realizar analizando los dos géneros tal y como se encuentran clasificados en la actualidad (Dahlgren et al. 1985).

El género *Androcymbium*, tal y como se encuentra definido actualmente (Willdenow 1808), está dividido en cinco secciones de especies basándose en diferentes caracteres morfológicos: sec. *Erythrostictus* (Bentham & Hooker 1883); sec. *Dregeocymbium* (Krause 1921); sec. *Marlothiocymbium* (Müller-Doblies & Müller-Doblies 2002); sec. *Kunkeliocymbium* (Müller-Doblies & Müller-Doblies 2002); sec. *Androcymbium* (Müller-Doblies & Müller-Doblies 1998, 2002). Las agrupaciones de especies en los diferentes clados de nuestra filogenia no concuerdan con las agrupaciones en secciones basadas en caracteres morfológicos, a excepción de las especies de la sección *Erythrostictus*, las cuales conforman el Clado que agrupa a las especies del norte de África y a dos especies de Namibia (*A. asteroides* y *A. roseum*) (Fig. 3.26). Las especies de esta sección se caracterizan por tener la lámina plana más larga que la uña. El resto de clados son formados por especies de diferentes secciones (Fig. 3.26). En el Clado que agrupa a las especies de Sudáfrica oriental, encontramos especies de las secciones *Kunkeliocymbium* y *Androcymbium*. El Clado 1B se encuentra formado por nueve especies de la sección *Androcymbium* y una de la sección *Kunkeliocymbium*.

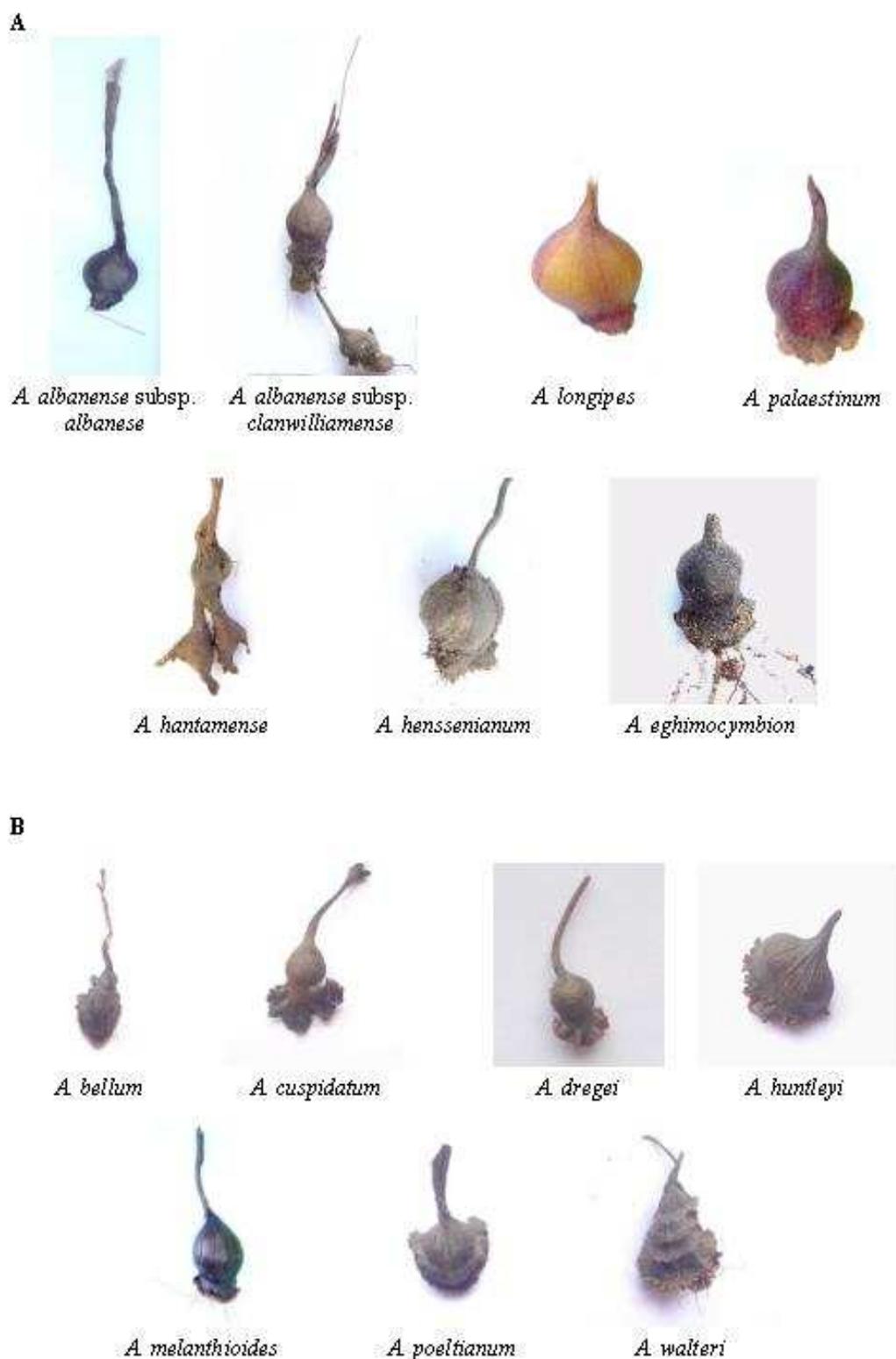


Fig. 3.25: cormos de diferentes especies del género *Androcymbium*. **A:** cormos de las especies que aparecen en el clado 1. División vegetativa tipo B o D (ver Fig. 1.3, pag. 35). **B:** cormos de las especies que aparecen en el clado 2 (ver Fig. 3.13). División vegetativa tipo C (ver Fig. 1.3, pag. 35).

En el Clado 2 encontramos especies de todas las secciones, a excepción de la sección *Marlathiocymbium* que solo esta formada por la especie *A. cruciatum*, especie que no hemos analizado pero que en el trabajo de Vinnersten & Reeves (2003) aparece con las especies que forman nuestro Clado 2. Parece ser, que los caracteres morfológicos elegidos para hacer las agrupaciones en secciones, no tienen un patrón evolutivo claro que se ajuste a la filogenia molecular.

Gracias a estos análisis moleculares y a la filogenia obtenida del género *Androcymbium* se han podido resolver dos cuestiones taxonómicas que afectaban a tres taxa. La primera de ellas es referente a la especie *A. albanense*. Esta especie fue descrita por Schönland (1904) a partir de una población encontrada en Sudáfrica oriental. Recientemente Pedrola-Monfort et al. (1999a) describieron una subespecie de *A. albanense* (*A. albanense* subsp. *clanwilliamense*) a partir de una población de Sudáfrica occidental. Posteriores análisis micromorfológicos de esta subespecie (Pedrola-Monfort, com. pers.) hicieron dudar sobre su asignación taxonómica, pensándose pues que podría tratarse de una especie nueva (*A. clanwilliamense*). En base a la gran diferenciación génica encontrada entre estas dos subespecies en los análisis RAPD's ($F_{ST} = 0,55$; $\theta_B = 0,44$) (capítulo 2) y a que se dispongan en clados separados en la filogenia, proponemos que *A. albanense* subsp. *clanwilliamense* Pedrola, Membrives & J.M. Monts., adquiera la categoría taxonómica de especie como *A. clanwilliamense* Pedrola & del Hoyo. La segunda cuestión taxonómica que se ha podido resolver es en relación a los taxa *A. roseum* y *A. asteroides*. *A. roseum* fue descrito por Engler (1889) a partir de los individuos de una población localizada en Namibia. Manning & Goldblatt (2001) describieron a *A. asteroides*, una especie muy parecida a la anterior, a partir de los individuos de una población del centro de la provincia del Cabo (Sudáfrica). Debido a la similaridad morfológica entre estos dos taxa, Müller-Doblies & Müller-Doblies (2002) las redefinieron como dos subespecies de *A. roseum* basándose en la longitud y el color de la lámina. La especie *A. roseum* pasó a denominarse *A. roseum* subsp. *roseum* Engler y *A. asteroides* paso a denominarse *A. roseum* subsp. *albiflorum* U. Müll-Doblies, Raus, Weiglin, D. Müll-Doblies (ver capítulo 1).



Fig. 3.26: árbol filogenético obtenido con métodos de inferencia Bayesiana con la organización en secciones según Müller-Doblies & Müller-Doblies (1998, 2002). Secc.: sección.

En nuestros análisis moleculares con RAPD's se obtuvieron elevados valores de diferenciación génica entre las dos subespecies ($F_{ST} = 0,60$; $\theta_B = 0,52$) (capítulo 2) y en la filogenia con secuencias de DNA no aparecen conjuntamente como era de esperar para dos subespecies. Por ello preferimos tratarlas como dos especies diferentes, de acuerdo con lo propuesto por Manning & Goldblatt (2001).

3.4.2 Evolución

3.4.2.1 PRECEDENTES

Datar los procesos evolutivos es muy importante para conocer las causas biológicas, geológicas o ambientales que han podido ayudar a promoverlos. La única aproximación que se había realizado para datar los procesos evolutivos de especiación en el género *Androcymbium* fue la llevada a cabo por Caujapé-Castells et al. (1999, 2001) con cpDNA – RFLP. En estos trabajos, los cuales solo contaban con especies del norte de África y Sudáfrica occidental, se situó el origen geográfico del género en Sudáfrica occidental y se dató en $45,5 \pm 11$ ma. (mediados Eoceno). Estos resultados se apoyaban en la hipótesis de la existencia de condiciones de aridez en el sur de África durante el Eoceno (Quézel 1978) las cuales favorecieron el origen de una flora xerofítica conocida como “Rand Flora” por Lebrun (1947). Estudios recientes sobre diferentes géneros de la flora de Sudáfrica occidental, realizados a partir de la secuenciación de DNA y utilizando la metodología del reloj molecular, apuntan hacia un origen de estos mas reciente (entre 7 y 20 ma) (Reeves 2001; Richardson et al. 2001; Goldblatt et al. 2002; Coleman et al. 2003; Linder 2003; Schire et al. 2003; Verboom et al. 2003; Bakker et al. 2004b; Linder & Hardy 2004). El origen de todos estos géneros y su posterior especiación esta asociada principalmente a la creación de la corriente de Benguela, fruto de la separación del continente Antártico de Sudamérica (entre 14 y 16 ma) (Siesser 1978). La formación de este corriente frío propició un incremento progresivo de la aridez, con una acusada sequedad estival y un descenso de la temperatura en Sudáfrica occidental hasta la formación del clima actual a finales del Mioceno – principios del Pleistoceno (Goldblatt & Manning 2002; Linder 2003). Este fue seguramente el factor mas importante que propició un cambio en la vegetación del sur de África (Goldblatt 1997). Antes de la formación de esta

corriente, la zona de Sudáfrica era rica en flora subtropical, y existen evidencias sobre la presencia de palmeras (Coetzee & Rogers 1982). Esa zona actualmente se encuentra formada por bosques arbustivos con formaciones esclerófilas o suculentas y no se encuentran palmeras (Goldblatt 1997).

3.4.2.2 ORIGEN DEL GÉNERO

Evidencias morfológicas (Membrives et al. 2003a, 2003b, 2003c), palinológicas (Martín et al. 1993), reproductivas (Membrives et al. 2002a), cariológicas (Margelí et al. 1999, Montserrat et al. 2002), aloenzimáticas (Membrives et al. 2001), y cpDNA RFLP's (Caujapé-Castells et al. 1999, 2001), señalaban a la zona de Sudáfrica occidental como la mas probable para el origen del género. Todos estos estudios se realizaron con especies que habitan en Sudáfrica occidental y en el norte de África, obviando de esta forma el rol que podían jugar las especies que habitan en Sudáfrica oriental, las que habitan en Namibia y dentro la Flora Zambesiaca (Zambia, Botswana y Zimbabwe).

Este es el primer trabajo realizado con el género *Androcymbium* que cuenta con especies de todas sus áreas de distribución en África. El hecho de contar con especies de otras regiones que no se habían analizado previamente, no ha conllevado la alteración de las hipótesis previas sobre este origen. El análisis de ancestralidad de áreas de Bremer (1992) y el método biogeográfico propuesto por Ronquist (1997) señalan a esta zona de Sudáfrica occidental como la mas probable de origen del género (Tabla 3.11; Fig. 3.20).

Nuestros análisis sugieren una datación para la separación del género *Androcymbium* de los géneros *Baeometra* y *Onixotis* de $16\pm 2,2$ ma (Fig. 3.21, nodo 92). Esta datación esta de acuerdo con la de muchos otros géneros de la flora xerofítica Africana con origen y centro de mayor diversificación en Sudáfrica occidental (Linder, com. pers.). Esta región sudafricana es conocida florísticamente como *Greater Cape Flora* (GCF) (Bayer 1984; Jürgens 1991, 1997), y agrupa a los biomas del *succulent Karoo* (NW de Sudáfrica y SW de Namibia) y de la *Cape Floristic Region* o fynbos (SW de Sudáfrica) (Fig. 3.27). Estas dos zonas se caracterizan por tener su principal época lluviosa en invierno y se diferencian en el nivel de aridez.

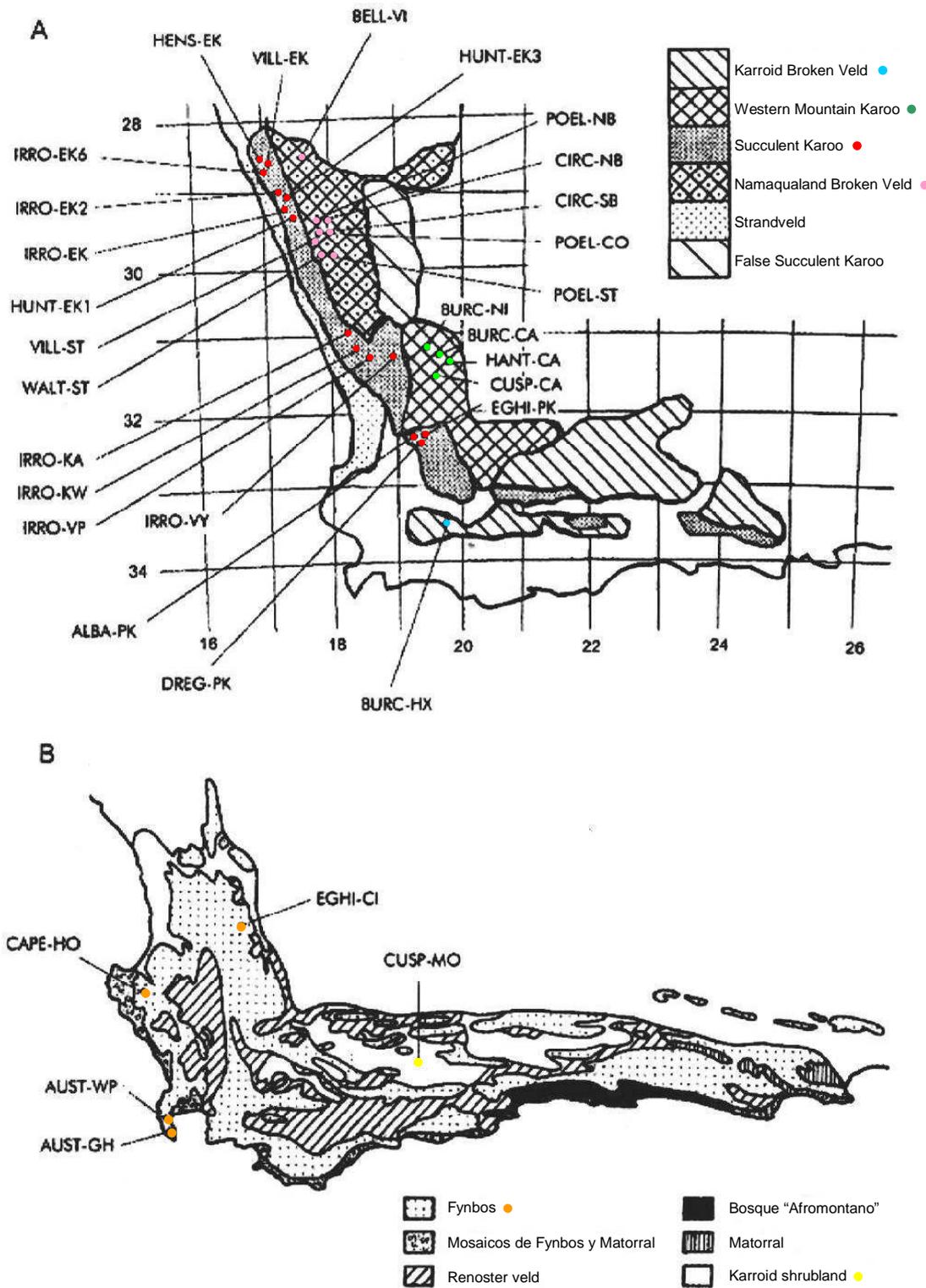


Fig. 3.27: mapa de vegetación de Sudáfrica occidental (según Acocks 1988) con la localización de las poblaciones de *Androcymbium* analizadas. **A:** comunidades vegetales del Karoo i tipo Karoides. **B:** comunidades vegetales de la Región del Cabo. Las abreviaciones de las poblaciones se describen en la tabla 3.1 (pag.102).

El *succulent* karoo presenta un régimen pluviométrico que varía entre 50 mm/año en las zonas más áridas del norte y 340 mm/año en su zona más húmeda. Más del 40% de esta lluvia cae durante el invierno, lo cual condiciona mucho el ciclo biológico de las especies vegetales (Milton et al. 1997). En el fynbos, la pluviometría varía desde los 210 mm/año en los valles interiores hasta cerca de los 400 mm/año en las zonas costeras, pudiendo llegar a 3000 mm/año en las regiones montañosas (Cowling et al. 1997). La temperatura media anual se encuentra entre 16 – 20°C, las heladas son escasas y las nevadas invernales solo suceden en las más zonas más altas (Linder et al. 1993). El origen de la GCF está asociada a la creación de la corriente de Benguela (entre 14 y 16 ma). Ello provocó un incremento progresivo de la aridez y un descenso de la temperatura en Sudáfrica occidental – sur de Namibia que se tradujo en una transición de una vegetación húmeda y subtropical, hacia una vegetación semidesértica (*succulent* karoo: SK) y mediterránea (*cape floristic region*: CFR) (Goldblatt & Manning 2002). Los grupos de plantas que soportaron este incremento de la aridez o que presentaban adaptaciones morfológicas que les confirieron una ventaja sobre el resto de grupos (p.e. geófitos, que son el 16% de los géneros de la GCF), pudieron desarrollarse y colonizar estas nuevas zonas áridas de donde desaparecieron los grupos de plantas adaptados a condiciones más húmedas.

La mayoría de especies del género *Androcymbium* que habitan en Sudáfrica occidental se encuentran distribuidas por el *succulent* karoo y solo unas pocas lo hacen en el fynbos (Fig. 3.27). Es muy importante observar que las especies de *Androcymbium* que se encuentran en la posición más basal en el árbol filogenético (Fig. 3.13, clado 2) habitan en el NW de Sudáfrica – S de Namibia, en el *succulent* karoo. Por ello, dentro de Sudáfrica occidental, parece ser que la región más probable de origen del género sería el NW de Sudáfrica – S de Namibia, donde actualmente habitan las especies de este género más basales en el árbol filogenético. Para confirmar esta hipótesis sería conveniente analizar las especies *A. amphigaripense*, *A. buchbergense*, *A. etesionamibiense* y *A. exiguum*, especies descritas recientemente dentro del género *Androcymbium* (Müller-Doblies & Müller-Doblies 2002) y que habitan en el extremo sur-occidental de Namibia, muy próximas con la frontera NW de Sudáfrica. Si estas aparecieran en posición basal en el árbol filogenético, se podría

decir que el posible origen geográfico del género se situaría en la zona del *succulent* karoo, entre el sur de Namibia y el norte de Sudáfrica occidental.

Tabla 3.13: región fitogeográfica y hábitat de las especies estudiadas.

ESPECIE	REGIÓN FITOGEOGRÁFICA	COMUNIDAD VEGETAL
Norte de África		
<i>A. gramineum</i> (España)	Mediterranea	Matorral xerofítico
<i>A. gramineum</i> (Marruecos)	Mediterranea	Matorral xerofítico
<i>A. hierrense</i>	Macaronésica	Matorral xerofítico
<i>A. palaestinum</i>	Mediterranea	Prados xerofíticos
<i>A. psammophilum</i>	Macaronésica	Comunidades psammofilas de playas
<i>A. rechingeri</i>	Mediterranea	Prados xerofíticos
<i>A. wyssianum</i>	Mediterranea	Prados xerofíticos
Sudáfrica occidental		
<i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i>	Karoo - Namib	Succulent Karoo
<i>A. austrocapense</i>	Cape Flora	Dunas del Fynbos
<i>A. bellum</i>	Karoo - Namib	Namaqualand
<i>A. burchellii</i> subsp. <i>burchellii</i>	Karoo - Namib	Karroid broken
<i>A. burchellii</i> subsp. <i>pulchrum</i>	Karoo - Namib	Montañas oeste del Karoo
<i>A. capense</i>	Cape Flora	Fynbos
<i>A. ciliolatum</i>	Karoo - Namib	Succulent Karoo
<i>A. circinatum</i>	Karoo - Namib	Namaqualand
<i>A. cuspidatum</i> (población CA)	Karoo - Namib	Montañas oeste del Karoo
<i>A. cuspidatum</i> (población MO)	Karoo - Namib	Karroid broken
<i>A. dregei</i>	Karoo - Namib	Succulent Karoo
<i>A. eghimocymbion</i> (población CI)	Cape Flora	Fynbos
<i>A. eghimocymbion</i> (población PK)	Karoo - Namib	Succulent Karoo
<i>A. hantamense</i>	Karoo - Namib	Montañas oeste del Karoo
<i>A. henssenianum</i>	Karoo - Namib	Namaqualand
<i>A. huntleyi</i>	Karoo - Namib	Succulent Karoo
<i>A. irroratum</i>	Karoo - Namib	Succulent Karoo
<i>A. poeltianum</i>	Karoo - Namib	Namaqualand
<i>A. villosum</i> (población EK)	Karoo - Namib	Succulent Karoo
<i>A. villosum</i> (población ST)	Karoo - Namib	Namaqualand
<i>A. walteri</i>	Karoo - Namib	Namaqualand
Sudáfrica oriental		
<i>A. albanense</i> subsp. <i>albanense</i>	Tongaland - Pondoland	Grassland
<i>A. austrocapense</i>	Cape Flora	Dunas del Fynbos
<i>A. decipiens</i>	Tongaland - Pondoland	Dunas costeras
<i>A. leistneri</i>	Afromontana	Nama-Karoo
<i>A. longipes</i>	Cape Flora	Bosque del oceano Índico
Namibia		
<i>A. asteroides</i>	Kalahari - Highveld Transition zone	Grassland
<i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	Kalahari - Highveld Transition zone	Grassland
<i>A. roseum</i>	Kalahari - Highveld Transition zone	Grassland

3.4.2.3 FORMACIÓN DE LOS PRIMEROS LINAJES EVOLUTIVOS

Hace $11,2 \pm 2$ ma., el ancestro del género *Androcymbium* empezó su radiación formando dos líneas evolutivos (Fig. 3.21, nodo A): (i) linaje *Androcymbium*, donde se incluyen especies de este género distribuidas por todo Sudáfrica (tanto occidental como oriental), sur del centro de África (*A. asteroides* y *A. roseum*) y cuenca Mediterránea (especies del Clado 1); (ii) linaje *Colchicum*, que dio lugar a especies del género *Androcymbium* que principalmente habitan en NW Sudáfrica – SW Namibia y al ancestro del género *Colchicum* (incluyendo *Bulbocodium* y *Merendera*) (especies del Clado 2). Los dos linajes empezaron curiosamente su radiación hace $10,2 \pm 2$ ma (Fig. 3.21, nodos B y C). Esta simultaneidad temporal de los dos linajes puede deberse a un cambio que afectara a los dos grupos por igual en Sudáfrica occidental. Seguramente este cambio pueda estar relacionado con la corriente de Benguela y su efecto en el incremento de la aridez, juntamente con la elevación del *Great Escarpment* (zona montañosa de Sudáfrica occidental) hace aproximadamente 10 ma. (Linder 2003). Esta elevación propició que la zona sur de África pasara de ser una peniplanicie de entre 500 y 700 m sobre el nivel del mar, a una zona mas abrupta con una elevación de 900 m durante el Plioceno (Partridge & Maud 2000). Esta elevación fue desigual y provocó un incremento en el gradiente pluviométrico debido a la intercepción del corriente de Agulhas (Tyson 1986). Consecuentemente, al este de la CFR el clima se volvió mas húmedo, mientras que la aridez estival en el *succulent* karoo se incrementó (Linder 2003). La suma de estos dos procesos, que provocaron grandes cambios en la climatología de Sudáfrica, habrían promovido el inicio de esta radiación.

3.4.2.4 DISJUNCIONES NORTE – SUR DE ÁFRICA

El género *Androcymbium* presenta una distribución disjunta de especies norte – sur de África. De las actualmente 56 especies reconocidas con las que cuenta este género (Müller-Doblies & Müller-Doblies 2002), 50 se hayan en el sur de África, mientras que tan solo 6 lo hacen norte de África – Islas Canarias. Este patrón de distribución disjunta se ajusta al de muchos otros géneros con una gran diversidad específica en el sur de África y con algunas especies representadas en el norte del continente (De Winter 1971). Ejemplos de estas disjunciones las podemos encontrar

en el género *Erica* (Ericaceae), que tiene 644 especies en el área sudafricana y tan solo 25 especies en el norte de África y Europa (Brown & Lomolino 1998), o en el género *Moraea* (Iridaceae) con cerca de 200 especies en Sudáfrica y solo una en la cuenca Mediterránea (Goldblatt et al. 2002). Otros ejemplos remarcables de esta distribución disjunta los encontramos en los generos *Aloe* (Aloaceae), *Dracaena* (Dracaenaceae), *Echium-Lobostemon* (Boraginaceae), *Olea* (Oleaceae), *Pelargonium* (Geraniaceae), etc.

Estas disjunciones podrían haberse originado por dispersión o vicarianza. La hipótesis dispersalista explica los patrones de distribución disjuntos debido a la desaparición de barreras preexistentes, mientras que la vicarianza lo explica por la aparición de barreras que fragmentan la distribución del taxa ancestral. A partir de nuestros datos y con nuestra filogenia, hemos encontrado evidencias de que esta disjunción se ha formado por dispersión desde Namibia hacia las zonas áridas del este de África, siendo la barrera preexistente una zona con clima más húmedo (Jürgens 1997). Esta “barrera” se ha demostrado que ha desaparecido en diversas ocasiones desde el Mioceno (van Zinderen Bakker 1969, 1975; Verdcourt 1969), creándose un corredor árido o *arid track* (Balinsky 1962) y permitiendo la dispersión de especies de clima árido entre estas dos zonas (Jürgens 1997).

Aparentemente, las especies estudiadas del género *Androcymbium* han utilizado por lo menos dos veces la formación del corredor árido para dispersarse desde las zonas áridas de Namibia hacia las zonas áridas del este de África. La primera dispersión la encontramos en la línea *Colchicum* de nuestra filogenia (Fig. 3.13, Clado 2) y fue realizada por un ancestro relacionado con *A. melanthioides* – *A. striatum*. La una segunda dispersión la encontramos en la línea *Androcymbium* (Fig. 3.13, Clado 1) y fue realizada por un ancestro relacionado con *A. roseum*. Seguramente, muchos de los géneros con esta misma distribución disjunta y que habitan en zonas de clima árido, han utilizado la formación de este corredor árido para llegar a Europa y a la cuenca Mediterránea.

3.4.2.5 EVOLUCIÓN DE LAS ESPECIES DE SUDÁFRICA OCCIDENTAL

En Sudáfrica occidental, dentro de la *Grate Cape Flora*, es donde el género *Androcymbium* cuenta con mayor número de especies. Todas las especies de este género que aquí encontramos, son endémicas de esta región y cuentan con muy

pocas poblaciones (Tabla 3.1). Las causas de esta gran diversidad de especies por parte de los géneros que deben su origen y su diversificación al incremento de la aridez de Sudáfrica occidental desde mediados del Mioceno, se debe principalmente a dos factores: el pluviométrico y el edáfico (Linder 2003). En esta zona de Sudáfrica hay un gran mosaicismo de hábitats. Ello se debe a la gran diversidad de suelos, a lo accidentado del paisaje y al extremadamente variable y complejo patrón pluviométrico (Goldblatt 1997), provocado en gran parte por la elevación del *Great Escarpment*. Si a ello le sumamos la naturaleza oligotrófica de los suelos, sobre todo en la CFR, la poca capacidad de dispersión de las semillas de la mayoría de los grupos de plantas (solo dispersadas por hormigas; max. 6 metros), y la estabilidad climática desde el Pleistoceno (esta zona no se vio afectada por las glaciaciones), encontramos pues la respuesta a la gran diversidad de especies en Sudáfrica occidental (Goldblatt & Manning 2002; Linder 2003).

Linder & Hardy (2004) señalan a la especiación gradual parapátrida como la mas probable forma de especiación en Sudáfrica occidental. Hipotetizan sobre una progresiva substitución de los grupos vegetales adaptados a vivir en condiciones subtropicales en el SW de África (p.e. Arecaceae, Casuarinaceae y Winteraceae), por grupos adaptados a las nuevas condiciones áridas (Asteraceae, Ericaceae, Fabaceae, Iridaceae, etc.). La dispersión de las semillas de la mayoría de los grupos es de corto alcance (Goldblatt & Manning 2002). La dispersión por animales (zoocoria), queda casi totalmente restringida a las hormigas, siempre y cuando las semillas dispongan de eleosoma, y con un alcance máximo de 6 metros (Linder 1985). Todas estas características propias de Sudáfrica occidental, favorecen un tipo de especiación parapátrida, provocan que los géneros cuenten con muchas especies (9,6 especies por género de media) y haya una gran endemividad (el 69,5% de las especies son endémicas) (Goldblatt & Manning 2002; Linder 2003).

Analizando las especies del género *Androcymbium*, las que forman el Clado 1 presentan una mayor distribución geográfica y se encuentran en una mayor cantidad de hábitats que las del Clado 2 (Fig. 3.27). La radiación de las especies que habitan en Sudáfrica occidental se inició hace 9,0 ma. (Mioceno inferior) y finalizó hace 3,0 ma. (Plioceno) (Fig. 3.21; Tabla 3.12). La especiación de este género se ajusta a la hipótesis

de especiación gradual parapátrida de Linder & Hardy (2004). Estas especies son endémicas y habitan en zonas geográficas muy reducidas. Las semillas no presentan ningún sistema de dispersión a larga distancia y se ha visto en la naturaleza que son transportadas por hormigas. Por tanto, su rango de dispersión no es superior a los 6 metros. Estas especies cuentan con muy pocas poblaciones y la diferenciación genética entre ellas es bastante importante (ver Capítulo 2) (Membrives et al. 2001). Dado que en el árbol filogenético encontramos especies estrechamente relacionadas que habitan en hábitats muy diferentes, se puede afirmar que la especiación parapátrida, unida al mosaicismo edáfico y a las diferencias microclimáticas, han sido los principales motores de la especiación del género *Androcymbium* en Sudáfrica occidental. Esta hipótesis es congruente con la de varios autores que proponían estos factores como el modo más importante de especiación de algunas familias sudafricanas (Linder & Vlok 1991; Cowling & Holmes 1992; Goldblatt & Manning 1996).

3.4.2.6 DISPERSIÓN DEL LINAJE *COLCHICUM*

Dentro del Clado 2 se encuentran las especies del género *Colchicum* (incluyendo a *Bulbocodium*, y *Merendera*), género que se encuentra ampliamente distribuido por Eurasia, y algunas especies del género *Androcymbium*. Una de estas especies es *A. melanthioides*, especie ampliamente distribuida por las zonas montañosas áridas de Namibia (altitudes entre 1000 – 2000 m.), por todo el norte de Sudáfrica (norte de la provincia del Cabo, norte del estado libre de Orange y norte del Transvaal) y llegando hasta Zimbabwe. El resto de especies de este clado pertenecientes al género *Androcymbium*, presentan una distribución más restringida y solo por la zona de Sudáfrica occidental

Androcymbium striatum es la especie de *Androcymbium* más relacionada con las especies de este género del Clado 2 que habita más al norte de África (Vinnersten & Reeves 2003) y es morfológicamente muy parecida a *A. melanthioides* (Müller-Doblies & Müller-Doblies 2002). Esta especie habita en las zonas montañosas áridas del Cuerno de África (Etiopía – Somalia). El Cuerno de África es un importante centro de especiación y de flora endémica (Thulin 1994) y se han establecido disjunciones florísticas entre las regiones áridas de esta zona y de la costa atlántica de Namibia

(Jürgens 1997). En *Androcymbium* encontramos un ejemplo de esta disjunción: *A. melanthioides* - *A. striatum*. La separación actual de estas zonas áridas se debe al Kalahari *gap* (región de clima continental) o al Kenia – Malawi *gap* (región con elevada humedad) (Jürgens 1997). Aunque actualmente estas dos regiones de clima árido se encuentren separadas por una zona con un clima mas húmedo, existen evidencias de la formación de un corredor árido que unió a estas dos zonas en diversas ocasiones durante la historia de África, sobretodo desde finales del Mioceno, conocido como el *arid track* (Balinsky 1962; van Zinderen Bakker 1969, 1975; Verdcourt 1969). La separación del género *Androcymbium* del género *Colchicum* se ha datado en 7,2 ma. (Mioceno superior). Esta datación debería de coincidir con la desaparición de uno de los varios corredores áridos que se formaron entre las zonas áridas de SW de África y E de África. Dada la estrecha relación filogenética entre las especies de *Androcymbium* del Clado 2 y las especies del género *Colchicum*, y que *A. striatum* habita en un importante centro de especiación como es el Cuerno de África, se podría pensar que un ancestro relacionado con *A. melanthioides*, proveniente de las zonas áridas de Sudáfrica occidental y gracias a la formación de un corredor árido, hubiera dado lugar al ancestro del género *Colchicum* en la región del Cuerno de África. Este, a su vez, desde el Cuerno de África y dada la proximidad con la Península Arábiga, habría llegado al continente Euro-Asiático por donde muchas especies del género *Colchicum* se encuentran actualmente distribuidas. Ciertamente, existen especies del género *Colchicum* en la Península Arábiga (*C. schimperi*) y en oriente medio (*C. ritchii*, *C. crocifolium*) (Persson, com. pers). Para corroborar esta hipótesis sería necesario analizar estas especies con hábitats mas meridionales del género *Colchicum* y la especie *A. striatum*, especie del género *Androcymbium* con el hábitat mas septentrional de las relacionadas con *Colchicum*.

3.4.2.7 DISPERSIÓN DEL LINAJE ANDROCYMBIUM

En la zona del sur de África se han identificado 45 especies del género *Androcymbium* (Müller-Doblies & Müller-Doblies 1998, 2002). De estas, 9 se encuentran exclusivamente en la zona de Sudáfrica oriental y solo una, *A. austrocapense*, cuenta con poblaciones en ambos extremos de la zona sur de Sudáfrica. Esta asimetría en cuanto a la distribución específica en esta disjunción es análoga a

las de otros muchos géneros de la flora xerofítica Africana como el género *Haemanthus* (Amaryllidaceae). Este género cuenta con 21 especies, 15 de las cuales se encuentran exclusivamente en Sudáfrica occidental y 5 en Sudáfrica oriental. Únicamente la especie *H. albiflorus* habita en ambas regiones (Snijman 1984). Ejemplos de esta distribución disjunta oeste – este de Sudáfrica también los encontramos en los géneros *Crassula* (Crassulaceae) (Jürgens 1997), *Ehrharta* (Gramineae) (Verboom et al. 2003), *Erica* (Ericaceae) (Oliver 2000), *Eugenia* (Myrtaceae) (van der Merwe et al. 2005), *Leucas* (Labiatae) (Ryding 1998), *Lotus* (Fabaceae) (Linder et al. 1992) y *Moraea* (Iridaceae) (Goldblatt et al. 2002).

La especie *A. austrocapense* se encuentra distribuida cerca de Ciudad de Cabo, en Sudáfrica occidental, y por la zona de Port Elizabeth hasta Port Alfred, en Sudáfrica oriental. Habita en las dunas del fynbos costero y ambas regiones se encuentran dentro de la región florística del Cabo, donde la época más importante de lluvias ocurre en invierno. Esta especie, aunque cuenta con poblaciones en Sudáfrica occidental, se encuentra estrechamente relacionada con las especies de Sudáfrica oriental (Fig. 3.13). Dado su patrón de distribución geográfica y teniendo en cuenta los ejemplos anteriores, se puede inferir la existencia de un sentido de dispersión oeste – este de Sudáfrica. Por tanto, un ancestro de esta especie podría haber llegado desde Sudáfrica occidental hasta Sudáfrica oriental, siguiendo la línea de la costa, originando las especies que actualmente se pueden encontrar. Este patrón biogeográfico con sentido oeste – este podría servir como modelo evolutivo para otras muchas especies con la misma distribución disjunta, visto que la disjunción oeste – este en Sudáfrica es muy común en muchos géneros de flora xerofítica africana.

El origen de las especies de Sudáfrica oriental se ha datado en 4,8 ma. (principios del Plioceno) (Fig. 3.21, nodo G). La falta de señal filogenética entre estas especies, la cual aparece en el árbol filogenético en forma de politomía (Fig. 3.13), se puede interpretar como una señal de rápida especiación (Hodges & Arnol 1995; Baldwin 1997; Baldwin & Sanderson 1998; Richardson et al. 2001a, b; Malcomber 2002; Verboom et al. 2003). El ancestro de todas estas especies parece estar relacionado con *A. austrocapense*, dado que es la única especie con poblaciones en

ambas zonas de Sudáfrica. El hecho de que todas las especies estudiadas de esta zona crezcan en hábitats muy diferentes (Tabla 3.13) y que las semillas tienen una capacidad de dispersión bastante reducida, podrían haber acelerado esta especiación.

Desde Sudáfrica oriental se podría haber originado el ancestro de *A. asteroides* hace 4,5 ma (Plioceno superior) (Fig. 3.21, nodo 60; Tabla 3.12). Esta especie se encuentra distribuida de este a oeste por el centro de Sudáfrica y asociada a los márgenes del río Orange y sus afluentes, por la zona que se conoce como Nama-Karoo, una gran altiplanicie que se extiende por el centro de Sudáfrica con elevaciones entre 550m y 1500m (Manning & Goldblatt 2001). Esta zona presenta muy poca precipitación (max. 400 mm/año, principalmente en verano), con temperaturas medias inferiores a los 0°C en invierno y superiores a los 30°C en verano (Palmer & Hoffman 1997). Aunque la precipitación sea escasa, *A. asteroides* puede desarrollarse gracias a que habita en los márgenes de los ríos y por tanto no depende de la precipitación para desarrollar su ciclo biológico. Dada su actual distribución por el centro y el norte de la provincia del Cabo y suroeste de Namibia, dentro del *Upper karoo*, en la región fitogeográfica Nama – Karoo, esta especie podría haberse dispersado de este a oeste de Sudáfrica siguiendo el curso del río Orange, río que nace en Lesotho, atraviesa todo el centro de Sudáfrica (Nama-Karoo) y desemboca en el Océano Atlántico justo en la frontera sur de Namibia. Las poblaciones de esta especie que hemos analizado se encuentran en Namibia, junto al margen del río Auob, afluente del Orange. Esta especie, como ya se ha comentado anteriormente, se encuentra estrechamente relacionada con *A. roseum*, y al igual que *A. asteroides* sus poblaciones se encuentran asociadas a cursos fluviales. La población estudiada de *A. roseum* se encuentra unos 300 km. al norte de las poblaciones estudiadas de *A. asteroides*, asociada a los márgenes del río Swakop, aunque cuenta con poblaciones en el centro y el norte de Namibia, radiando hasta Angola por el norte y hasta Zambia por el este, todas ellas dentro de la región fitogeográfica Sudano – Zambeziana (Jürgens 1997). Sus poblaciones más septentrionales se han localizado al norte de Zambia (Pedrola-Monfort 1993; pag. 118). Esta especie, dada su actual distribución geográfica y al hecho que se encuentre asociada a cursos fluviales, podría haberse dispersado desde las zonas áridas del suroeste de África hasta el este

del continente gracias a la formación de uno de los varios corredores áridos que se formaron desde finales del Mioceno (van Zinderen Bakker 1969, 1975; Verdcourt 1969) y al arrastre de los ríos. Dada su aparente imposibilidad de establecer poblaciones lejos de sitios que experimentan inundaciones periódicas y a la necesidad de condiciones áridas para su desarrollo, es posible sugerir que esta especie, o un ancestro de esta, podría haberse dispersado desde las zonas áridas del este de África hasta la cuenca Mediterránea siguiendo el curso de los ríos. Ciertamente, existen evidencias geológicas indicando la existencia de un curso de agua desde finales del Mioceno que conectaba la zona central del este de África con el norte del continente: el Eonilo (Said 1981, 1993). La evaporación del mar Mediterráneo a finales del Mioceno (crisis del Mesiniense) (Hsü et al. 1973, 1977) provocó un gran desnivel entre las zonas altas del Eonilo y su desembocadura, provocando que el agua fluyera con gran fuerza y erosionando el terreno hasta la formación de lo que se conoce como el cañón del Eonilo (Said 1993). Gracias a este curso fluvial formado desde finales del Mioceno y a su fuerza de arrastre, *A. roseum* o un ancestro de este, podría haber llegado desde el este de África hasta la cuenca Mediterránea, originando las especies que actualmente encontramos en el norte de África.

Jürgens (1997), es su trabajo sobre diversidad florística e historia de las regiones áridas de África, indica la existencia de especies distribuidas de forma disjunta en estas dos regiones áridas de África, que se habrían dispersado gracias a la formación de un corredor árido. La desaparición del corredor árido y la formación nuevamente de una zona húmeda, provocó su separación y especiación en diferentes taxa. De forma contraria a lo ocurrido en la dispersión hacia el norte de África de la línea *Colchicum*, donde encontramos a *A. melanthioides* en las zona áridas del SW de África y a *A. striatum* en el NE de África, en la dispersión de la línea *Androcymbium* no encontramos especies disjuntas de este género relacionadas filogenéticamente en ambas regiones áridas fruto de esta dispersión por el corredor árido. En el árbol filogenético de Vinnersten & Reeves (2003), se observa a la especie *Merendera schimperiana* formando un clado con *A. gramineum*, única especie del género *Androcymbium* analizada en este estudio que habita en el norte de África, y en

posición basal a estas *A. asteroides* y las especies de Sudáfrica oriental (Fig. 3.24). Esta especie, *M. schimperiana*, habita en el Cuerno de África y su posición en el árbol filogenético de Vinnersten & Reeves (2003) hacía dudar sobre su pertenencia al género *Merendera*. Un análisis de la morfología de esta especie ha provocado que Persson (com. pers.) se haya decidido a cambiar *Merendera schimperiana* Hochst. por *Androcymbium schimperianum* (Hochst.) K.Perss., debido a la presencia de unos puntitos oscuros distribuidos a lo largo de los segmentos del perianto (seguramente idioblastos), los cuales son característicos del género *Androcymbium* pero nunca vistos en *Merendera*. Esta nueva especie, hasta la fecha descrita como *Merendera schimperiana*, dada su posición en el árbol filogenético de Vinnersten & Reeves (2003) y el análisis morfológico de Persson (com. pers), se podría inferir que podría pertenecer al género *Androcymbium* y ser la especie hermana de *A. roseum* que quedó aislada en el Cuerno de África una vez desapareció el corredor árido. Si esta especie, *M. schimperiana*, se confirma como parece que pertenece al género *Androcymbium*, probablemente sería el ancestro más reciente de las especies del norte de África. Para corroborar esta hipótesis sería necesario un profundo estudio morfológico y comprobar con mayor detalle (analizar más fragmentos de DNA) su posición filogenética en relación con *A. asteroides*, *A. roseum*, y con las especies del norte de África.

En los análisis con el reloj molecular, se ha datado el ancestro del Clado que agrupa a las especies del norte de África y *A. roseum* en 3,2 ma. (mediados del Plioceno). Estos resultados parecen indicar que un ancestro relacionado con *A. roseum* llegó a la Cuenca Mediterránea procedente del Cuerno de África y gracias al arrastre del río Eonilo, a mediados del Plioceno dando lugar posteriormente a las especies del norte de África. Dentro de las especies del norte de África se pueden establecer dos grupos: (i) grupo formado por *A. gramineum*, *A. palaestinum* y *A. rechingeri*; (ii) grupo formado por *A. hierrense*, *A. psammophilum* y *A. wyssianum* (Fig. 3.13). Desgraciadamente, dada la poca señal filogenética que encontramos debida seguramente a su rápida y reciente especiación, resulta muy difícil resolver las relaciones filogenéticas dentro de estos dos grupos. El origen del primer grupo se ha datado en 2,4 ma., mientras que el del segundo en 2,7 ma. (finales Plioceno).

En el árbol filogenético (Fig. 3.13) se observa un clado fuertemente soportado (PP = 88%; PP = 89%) que agrupa a las especies del norte de África y a dos especies de Namibia (*A. asteroides* y *A. roseum*). Ya que en estos últimos años en el J.B.M. se ha conseguido obtener híbridos entre las especies del norte de África (en algunos casos se han obtenido generaciones F2 fértiles) y dada la estrecha relación filogenética encontrada entre estas dos especies de Namibia y las del norte de África, se quiso comprobar cual era el nivel de aislamiento reproductivo entre estas especies. Debido a que en cultivo en el invernadero de investigación del JBM hay muy pocos individuos de estas dos especies de Namibia, a que no todos florecían cada año y a que estos se utilizaban para analizar su sistema reproductivo (autocompatible – autoincompatible; ver Capítulo 1), los cruces se realizaron utilizando a las especies del norte de África como receptoras del polen (madres) fecundándolas con el polen de estas dos especies (padres). En los cruces donde se utilizó a *A. asteroides* como padre, se obtuvieron semillas de todas las especies fecundadas a excepción de en *A. hierrense*. Estas semillas una vez sembradas, en ningún caso llegaron a germinar (Tabla 3.14; Fig. 3.28a). En los cruces donde se utilizó a *A. roseum* como padre, se obtuvieron semillas de todas las especies fecundadas. Se sembraron todas ellas y solo germinaron las provenientes de los cruces con *A. gramineum*, *A. palaestinum* y *A. rechingeri* (Tabla 3.14; Fig.3.28b). En un caso se utilizó un individuo de *A. roseum* como madre y se fecundó con el polen de *A. gramineum*. De este cruce se obtuvieron semillas y estas han germinado, resultando ser pues viables. Estos resultados reflejan lo que se observa en la filogenia, visto que *A. roseum* se encuentra mas estrechamente relacionado filogenéticamente con las especies del norte de África que *A. asteroides* y que solo se producen semillas viables en los cruces de *A. roseum* con *A. gramineum*, *A. palaestinum* y *A. rechingeri*, especies con las que aparece agrupado en un mismo clado (Fig. 3.13).

Tabla 3.14: resultados de las pruebas de cruzabilidad entre *A. asteroides* y *A. roseum* con las especies del norte de África. Antes de fecundar los individuos receptores estos se emascularon (eliminación de las anteras antes de madurar) para evitar autofecundaciones. Una vez fecundados fueron tapados con una malla de tul para evitar fecundaciones cruzadas con el polen de otros individuos de su misma especie.

Receptor	Dador	Producción de semillas	Germinación de las semillas
<i>A. gramineum</i>	<i>A. asteroides</i>	✓	✗
	<i>A. roseum</i>	✓	✓
<i>A. hierrense</i>	<i>A. asteroides</i>	✗	✗
	<i>A. roseum</i>	✓	✗
<i>A. palaestinum</i>	<i>A. asteroides</i>	✓	✗
	<i>A. roseum</i>	✓	✓
<i>A. psammophilum</i>	<i>A. asteroides</i>	✓	✗
	<i>A. roseum</i>	✓	✗
<i>A. rechingeri</i>	<i>A. asteroides</i>	✓	✗
	<i>A. roseum</i>	✓	✓
<i>A. wyssianum</i>	<i>A. asteroides</i>	✓	✗
	<i>A. roseum</i>	✓	✗
<i>A. roseum</i>	<i>A. gramineum</i>	✓	✓

Pruebas realizadas en los años 2003 - 2004 y 2004 - 2005.

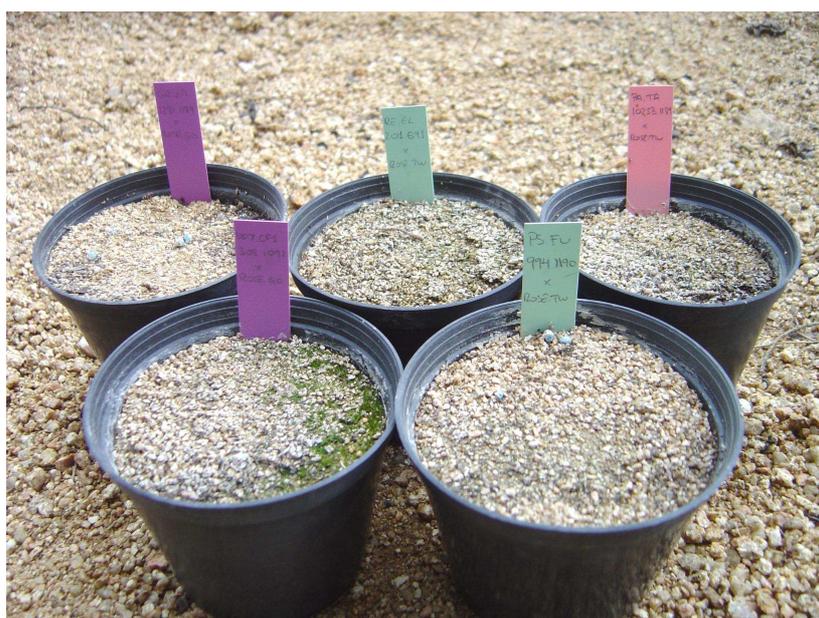


Fig. 3.28a: resultados de la siembra de semillas producto de los cruces de las especies del norte de África con *A. asteroides*.



Fig. 3.28b: semillas germinadas de los cruces entre las especies del norte de África y *A. roseum*.

3.4.2.8 COLONIZACIÓN DE LAS ISLAS CANARIAS

Existen muchos estudios sobre el origen de los diferentes grupos de plantas que habitan en las Islas Canarias y en la mayoría de ellos se apunta hacia un origen Mediterráneo (Böhle et al. 1996; Mes et al. 1996; Francisco-Ortega et al. 1997, 1999; Thiv et al. 1999; Helfgott et al. 2000; Barber et al. 2002; Allan et al. 2004).

El origen de las especies de *Androcymbium* que habitan en las Islas Canarias (*A. hierrense* en El Hierro, La Palma y La Gomera; *A. psammophilum* en Lanzarote y Fuerteventura) ha sido siempre objeto de discusión. Pedrola-Monfort & Caujapé-Castells (1998) propusieron tres hipótesis que podrían explicar el origen de las dos especies de Canarias. La primera es que fueron originadas a partir de dos taxa provenientes del continente. La segunda posibilidad es que un solo taxa del continente habría colonizado los dos grupos de islas en dos momentos diferentes. La tercera hipótesis asume la existencia de un taxa en el continente que habría originado a un primer taxa en Canarias, seguramente *A. hierrense* dada la historia geológica de estas islas (Fernández-Palacios & Martín-Esquível 2001). Este a su vez, sería el ancestro del otro taxa de Canarias, *A. psammophilum*.

Caujapé-Castells et al. (2001), a partir de sus datos de cpDNA – RFLP, indicaban que el origen de las especies de las Islas Canarias podría ser explicado por una sola colonización a partir de un ancestro relacionado con la especie norteafricana *A. wyssianum*, apoyando así la tercera hipótesis. La mayoría de estudios sobre el origen de los taxa en Canarias, sugieren un único origen seguido por una especiación insular (p.e. *Argyranthemum* (Asteraceae) [Francisco-Ortega et al. 1997]; *Bencomia* (Rosaceae) [Helfgott et al. 2000]; *Crambe* (Brassicaceae) [Francisco-Ortega et al. 1996]; *Gonospermum* (Asteraceae) [Francisco-Ortega et al. 2001]; *Lotus* (Fabaceae) [Allan et al. 2004]; *Pericallis* (Asteraceae) [Panero et al. 1999]; *Sideritis* (Lamiaceae) [Barber et al. 2002]; *Sonchus* (Asteraceae) [Kim et al. 1996]), tal y como se propone en Caujapé-Castells et al. (2001).

En nuestro árbol filogenético hemos encontrado una estrecha relación entre *A. wyssianum* y las especies de las Islas Canarias (PP=100) (Fig. 3.13), apoyando la hipótesis que proponían Caujapé-Castells et al. (2001). Pero a diferencia de los anteriores estudios, para este se ha contado con una nueva población de *A. wyssianum* de Essaouira (Marruecos), en la costa Atlántica. Esta población (Hap. 2) presenta diferencias genéticas importantes respecto al resto de poblaciones de *A. wyssianum* (Hap. 1), aunque todas las poblaciones, incluyendo esta, se agrupan dentro del mismo clado. Esta población de Essaouira se encuentra muy estrechamente relacionada con las especies de las Islas Canarias (PP=100) (Fig. 3.13). Dado que ha sido imposible obtener individuos F1 de los cruces *A. wyssianum* × *A. hierrense* y *A. wyssianum* × *A. psammophilum*, se elimina la posibilidad de introgresión, es decir, que polen de las especies de las islas haya podido fecundar a individuos de *A. wyssianum* del continente obteniéndose una población diferente. Por tanto, parece ser que desde la población de Essaouira (costa Atlántica de Marruecos) se produjo la colonización de las Islas Canarias por parte del género *Androcymbium*. Es muy probable que las tormentas de arena, muy frecuentes en el Sahara, hubiesen servido para llevar cápsulas con semillas o individuos enteros desde la costa de Marruecos hasta el archipiélago canario. Dada las características geológicas de las Islas Canarias, es muy probable que *A. wyssianum* hubiera dado lugar a *A. hierrense*. Esta especie habita en las islas mas occidentales del archipiélago, islas han sufrido menos

catástrofes volcánicas y cuentan con una vegetación mas antigua (Santos-Guerra 2001). Las islas de Lanzarote y Fuerteventura son dos de las mas antiguas del archipiélago canario (15,5 ma. y 20,5 ma. respectivamente), pero su flora es mucho mas reciente (Fernández-Palacios & Martín-Esquível 2001). Esto se debe a los continuos episodios de vulcanismo durante el cuaternario que habrían extinguido la flora más antigua, existiendo actualmente una flora más moderna que en las islas mas occidentales. Entonces, parece ser que *A. hierrense*, y no *A. wyssianum* de Essaouira, podría haber dado lugar a *A. psammophilum*. Datos de cruzabilidad corroboran esta hipótesis de estrecha relación entre las especies insulares, ya que se han producido individuos F2 con floración al cruzar las dos especies insulares, aunque presentan una fuerte barrera prezigótica entre ambos taxa insulares.

Los resultados obtenidos con el reloj molecular ha datado el origen de los taxa de Canarias en 1,64 ma. (Fig. 3.21, nodo 55; Tabla 3.12). Esta datación está de acuerdo con la de los escasos estudios donde se ha procedido a datar el origen de la flora canaria relacionada con un taxa continental (Santos-Guerra 2001). Esta reciente especiación se encuentra también soportada por los datos de genética poblacional, ya que la diferenciación génica encontrada dentro de los taxa canarios es muy baja (Capítulo 2).

3.5 CONCLUSIONES

- El género *Androcymbium*, tal y como se encuentra definido actualmente, no es monofilético, dada la inclusión en un mismo clado de especies de este género conjuntamente con otras especies del género *Colchicum* (incluyendo a *Bulbocodium* y *Merendera*).
- Las especies de *Androcymbium* que aparecen en el Clado 2 del árbol filogenético están muy relacionadas con las especies del género *Colchicum* dado que aparecen juntas en un mismo clado. El análisis filogenético de las nuevas especies descritas por Müller-Doblies & Müller-Doblies (2002) del sur de Namibia, de *A. striatum* (especie que habita en el Cuerno de África) y de mas especies del género *Colchicum*, sobretodo aquellas que habitan en la Península Arábrica, podrían ayudar a resolver las relaciones evolutivas y taxonómicas entre los géneros *Androcymbium* y *Colchicum*.
- El origen de género *Androcymbium* se ha situado en Sudáfrica occidental tal y como indican los análisis biogeográficos. Seguramente este origen se localizaría en una zona del norte de Sudáfrica – sur de Namibia, dentro del bioma del *succulent karoo*.
- Según los análisis con el reloj molecular, la separación del género *Androcymbium* de los géneros *Baeometra* y *Onixotis* se ha datado en $16 \pm 2,2$ ma. Hace $11,2 \pm 2,2$ ma. empezó su radiación generándose dos linajes: (i) linaje *Androcymbium* y (ii) linaje *Colchicum*.
- El linaje *Androcymbium* está formado únicamente por especies de este género y estas se distribuyen por Sudáfrica occidental y oriental, Namibia – Flora Zambesiaca y norte de África – Islas Canarias. El linaje *Colchicum* está formado por especies del género *Androcymbium* y *Colchicum* y estas se distribuyen por el norte de Sudáfrica (*succulent karoo* y *Karoo – Namib region*), Namibia, Cuerno de África (especies del género *Androcymbium*) y región Euroasiática (especies del género *Colchicum*).

- Las dataciones obtenidas con la metodología del reloj molecular se ajustan a la de otros muchos géneros de la flora xerofítica de Sudáfrica occidental y difieren de las obtenidas en estudios previos por Caujapé-Castells et al. (1999, 2001).
- El inicio de la especiación de *Androcymbium* parece estar asociado al incremento de la aridez en Sudáfrica occidental desde mediados del Mioceno fruto de la generación de la corriente fría de Benguela originada por la separación de la Antártida de Sudamérica. También se encuentra asociado a diferentes procesos orogénicos ocurridos en el *Great Escarpment* (cordillera de Sudáfrica occidental) que provocó grandes gradientes pluviométricos acentuando así el gran mosaicismo de hábitats de Sudáfrica occidental.
- La radiación de los dos linajes encontradas empezó de forma simultánea (hace $10,2 \pm 2$ ma.) debido a que fueron afectadas por los mismos factores que promovieron su especiación (seguramente los mas importantes serian los dos citados anteriormente). Estos dos linajes parecen presentar historias evolutivas paralelas, dado que se originaron en Sudáfrica occidental y acabaron dispersándose hacia el norte del continente.
- Las especies que habitan en Sudáfrica oriental tiene su origen en Sudáfrica occidental y este podría estar relacionado con un ancestro de *A. austrocapense*, única especie que cuenta con poblaciones en ambas zonas de África austral. Estas especies de Sudáfrica oriental, a su vez, son mas antiguas que las del norte de África.
- La dispersión hacia el norte del continente de los dos linajes encontrados parece estar muy relacionada con la formación de diversos corredores áridos que unieron las zonas áridas del SW y del E de África desde finales del Mioceno. Estos corredores fueron utilizados en la dispersión del linaje *Androcymbium* por algún ancestro relacionado con *A. roseum* – *A. (M.) schimperianum* y en la dispersión del linaje *Colchicum* por algún ancestro relacionado con *A. melanthioides* – *A. striatum*.
- La presencia de especies del género *Androcymbium* en el norte de África se debe principalmente al curso del río Eonilo (ancestro del Nilo) que propició que la especie de este género que llegó hasta el Cuerno de África y con hábitat

asociado a los cursos fluviales (algún ancestro de *A. roseum*) pudiera dispersarse hacia la Cuenca Mediterránea.

- Las especies del norte de África están estrechamente relacionadas filogenéticamente con *A. roseum*, especie de Namibia, como lo demuestra su ubicación topológica en los árboles estudiados. Los resultados de las pruebas de cruzabilidad también corroboran esta hipótesis.
- Las especies de las Islas Canarias parecen tener un origen continental relacionado con *A. wyssianum* y concretamente esta relación es mas probable que sea con la población de Essaouira (Marruecos), dado los resultados encontrados en el árbol filogenético.

Discusión general

DISCUSIÓN GENERAL

Esta tesis doctoral se ha enfocado a dos niveles evolutivos diferentes pero complementarios: macro y microevolutivos. Con el estudio realizado a nivel microevolutivo (análisis de la variabilidad genética poblacional) se han podido resolver los aspectos descriptivos de los patrones de distribución de esta variabilidad en el género *Androcymbium*, ya que en los trabajos y tesis previas se habían estudiado las especies del norte de África (Pedrola-Monfort 1993; Pedrola-Monfort & Caujapé-Castells 1994, 1996) y de Sudáfrica occidental (Membrives 2000; Membrives et al. 2001). Por tanto, quedaban por analizar dentro de este género las especies de Namibia y Sudáfrica oriental. De esta forma se han planteado los patrones de diversidad genética y comprendido así como se encuentra distribuida esta variabilidad genética en las cuatro zonas geográficas donde encontramos la gran mayoría de especies de este género: norte de África, Namibia, Sudáfrica occidental y Sudáfrica oriental. Así pues la componente interpoblacional es muy importante para explicar la distribución de la variabilidad genética en las especies Sudáfrica oriental, al igual como se observó en las especies de Sudáfrica occidental. Contrariamente, la componente intrapoblacional es la que explica la distribución de la variabilidad genética en las especies de Namibia, tal y como se observó con las especies del norte de África. También hemos comprobado y resuelto en forma de síntesis para este género que la cantidad de variabilidad genética poblacional está correlacionada con el sistema reproductivo, mostrando niveles superiores aquellas especies xenógamas o autoincompatibles. Otra base de evidencias originarias en este estudio nos permite afirmar que la distribución de la variabilidad genética dentro de las especies del género *Androcymbium* se debe a los factores histórico-ambientales acaecidos en las poblaciones naturales y no dependen por tanto de las relaciones filogenéticas o evolutivas de los taxa. Es a partir de aquí donde se pasa en este trabajo del nivel micro al macroevolutivo.

En primer lugar constatamos que esta es la primera filogenia del género donde se cuenta con especies de todas sus áreas de distribución, ya que en la anterior realizada por Caujapé-Castells et al. (1999) con cpDNA-RFLP solo se contaba con especies del norte de África y Sudáfrica occidental. Analizando la topología del árbol

filogenético resultante y la cantidad y distribución de la variabilidad genética de todas las especies analizadas, se ha podido corroborar que estas no están relacionadas, tal y como indicaba Olmstead (1990) y como señalaban Membrives et al. (2001) con las especies del norte de África y Sudáfrica occidental. También uniendo los trabajos a nivel micro y macroevolutivo se han podido solventar dos cuestiones referentes a la taxonomía de tres especies del género. La primera es referente a *A. asteroides* y *A. roseum*, ya que Müller-Doblies & Müller-Doblies (2002) las consideraban dos subespecies de *A. roseum* (subsp. *albiflorum* y subsp. *roseum* respectivamente). Gracias a los estudios de diferenciación poblacional y a la filogenia molecular se ha podido determinar que son dos especies diferentes, corroborando y apoyando aquí la propuesta realizada por Manning & Goldblatt (2001).

La segunda cuestión se refiere a *A. albanense*. Hasta la fecha se consideraba que existían dos subespecies de esta especie: subsp. *albanense* y subsp. *clanwilliamense*. Como en el caso anterior y utilizando las mismas herramientas moleculares, se ha podido establecer que son dos especies diferentes, *A. albanense* y *A. clanwilliamense*, siendo esta última una especie nueva aun por publicar. Un hecho muy importante descubierto en este estudio y que no se atisbaba en los anteriores trabajos con este género (Caujapé-Castells et al. 1999, 2001) es que *Androcymbium* no es monofilético, dada la aparición en un mismo clado de especies de este género con especies del género *Colchicum* (incluyendo a *Bulbocodium* y *Merendera*). Esto mismo se empezó a observar en un trabajo realizado por Vinnerstern & Reeves (2003) con la familia Colchicaceae y publicado mientras se realizaba esta tesis, donde se analizaron 17 especies de *Androcymbium* y 10 de *Colchicum* (incluyendo a *Bulbocodium* y *Merendera*). Este agrupación de taxa nos ha hecho reflexionar sobre la actual clasificación taxonómica del género, ya que siguiendo los criterios de agrupación genérica propuestos por la APG (1998, 2003) estos deben tener un origen monofilético. En este trabajo se ha propuesto tratar a estos dos clados como linajes: linaje *Androcymbium* formado únicamente por las especies de este género que forman el clado 1 y linaje *Colchicum* formado por las especies de *Androcymbium* y *Colchicum* que forman el clado 2. Esta agrupación en linajes se ha propuesto con cautela y como medida provisional, dado que en este trabajo solo se han analizado cinco especies del género *Colchicum*, y a

la espera de poder realizar una filogenia del género *Colchicum* analizando las mismas regiones genómicas utilizadas para *Androcymbium*. Por suerte esta filogenia se realizará en breve en colaboración con el Natural History Museum of Denmark en Copenhague, pudiendo de esta forma combinar y analizar todos los datos de las secuencias de estos dos géneros conjuntamente, con el objetivo de resolver la taxonomía de estos dos grupos. Con esta filogenia también hemos podido corroborar las hipótesis que se planteaban en los estudios filogenéticos previos (Caujapé-Castells et al. 1999, 2001) acerca sobre el origen del género, que lo situaban en Sudáfrica occidental. La inclusión de nuevos taxa de Namibia y Sudáfrica oriental no solo no ha alterado esta hipótesis, sino que han ayudado a darle aun más robustez si cabe. Referente a la filogeografía y a la datación de los procesos evolutivos sufridos por este género, este trabajo a servido para trazar la dispersión geográfica de este género a traves de África y a datar estos procesos utilizando la metodología del reloj molecular. Una vez situado el origen del género en Sudáfrica occidental y datado en $11,2 \pm 2$ ma., se han podido distinguir dos linajes evolutivos con historias evolutivas paralelas: origen en Sudáfrica occidental y dispersión hacia el norte del continente. El linaje *Androcymbium* radió por Sudáfrica occidental y se dispersó hacia Sudáfrica oriental siguiendo la línea de la costa, dando lugar a las especies de esta región. Uno de esos taxa, *A. asteroides*, siguiendo el curso de río Orange, de dispersó por el centro de Sudáfrica llegando hasta el sur de Namibia, donde dio lugar a *A. roseum*. Este taxa, que actualmente se encuentra distribuido por todo Namibia radiando hasta Angola por el norte y hasta Zambia por el este, se dispersó hacia el norte de África gracias a la formación de uno de los varios corredores áridos formados a finales del Mioceno y durante el Plioceno, que unió las zonas áridas del suroeste y este de África, y gracias al curso de río Eonilo (ancestro del actual Nilo), propiciando que pudiera llegar a la cuenca Mediterránea y radiar, dando lugar a las actuales especies de este género del norte de África. El linaje *Colchicum* también se dispersó y radió inicialmente por el norte de Sudáfrica occidental y sur de Namibia. Al igual que en el linaje anterior también hubo una dispersión hacia las zonas áridas del este de África (Cuerno de África) pero probablemente sin el paso previo por Sudáfrica oriental. Esta dispersión fue debida seguramente a un ancestro relacionado con *A. melanthioides*, dada sus características biológicas y su actual distribución, y como en el

caso anterior favorecida por la formación de uno de los corredores áridos. A diferencia del linaje *Androcymbium*, este linaje se dispersó y radió por Eurasia, teniendo su puerta de entrada en la Península Arábiga, y encontrando en este amplio continente únicamente a la especies del género *Colchicum*.

Con esta tesis se ha cerrado el círculo respecto a los trabajos de genética poblacional con el género *Androcymbium* realizados en el Jardí Botànic Marimurtra y se constata un “género modelo” para los estudios sobre filogeografía y evolución de géneros de la flora xerofítica africana con distribución disjunta norte – sur de África. Este es un fenómeno intrigante entre los biogeógrafos, ya que 63% de los géneros de la flora xerofítica sudafricana presentan esta distribución disjunta.

Bibliografía

- ACOCKS, J. P. H., [eds.]. 1988. Veld types of South Africa. Botanical Research Institute.
- AKAN, H., & I. EKER, 2005. Check-list of the genus *Colchicum* in the Flora of Turkey. *Turkish Journal of Botany* **29**: 327-331.
- ALDRICH, J., B. W. CHERNEY, E. MERLIN, & L. CHRISTOPHERSON, 1988. The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Current Genetics* **14**: 137-146.
- ALLAN, G. J., J. FRANCISCO-ORTEGA, A. SANTOS-GUERRA, E. BOERNER, & E. A. ZIMMER, 2004. Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island *Lotus* (Fabaceae: Loteae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 123-138.
- APG [ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP], 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **83**: 531-553.
- APG [ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP], 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Bot. J. Linn. Soc.* **141**: 399-436.
- AZUMA, H., L. B. THIEN, & S. KAWANO, 1999. Molecular phylogeny of *Magnolia* (Magnoliaceae) inferred from cpDNA sequences and evolutionary divergence of the floral scents. *Journal of Plant Research* **112**: 291-306.
- AZUMA, H., J. G. GARCÍA-FRANCO, V. RICO-GRAY, & L. B. THIEN, 2001. Molecular phylogeny of the Magnoliaceae: the biogeography of tropical temperature disjunctions. *American Journal of Botany* **88**: 2275-2285.
- BACKLUND, A., & K. BREMER, 1998. To be or not to be - principles of classification and monotypic plant families. *Taxon* **47**: 391-400.
- BAKER, J. G., 1874. On the genus *Androcymbium*, with descriptions of seven new species. *Journ. Linn. Soc. Bot.* **X**: 243-245.
- BAKER, J. G., 1879. A synopsis of *Colchicaceae* and the aberrant tribes of *Liliaceae*. *J. Linn. Soc. London., Bot.* **17**: 405-510.
- BAKER, J. G., 1897. Flora Capensis. Liliaceae. *Th. Dyer.* **6**: 516-520.
- BAKKER, F. T., A. CULHAM, C. E. PANKHURST, & M. GIBBY, 2000. Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae). *American Journal of Botany* **87**: 727-734.
- BAKKER, F. T., A. CULHAM, P. HETTIARACHI, T. TOULOUMENIDOU, & M. GIBBY, 2004. Phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae) based pm DNA sequences from three genomes. *Taxon* **53**: 17-31.
- BAKKER, F. T., A. CULHAM, A. MARAIS, & M. GIBBY. 2004. Nested radiation in Cape *Pelargonium*. In F. T. Bakker, L. W. Chatrou, B. Gravendeel, and P. B. Pelser [eds.], *Plant species-level systematics: new perspectives on pattern and process*. Koeltz, Königstein.
- BALDWIN, B. G. 1997. Adaptive radiation of the Hawaiian silver-sword alliance: congruence and conflict of phylogenetic evidence from molecular and non-molecular

investigations, pp. 103-128. In T. J. Givnish and K. J. Sytsma [eds.], *Molecular evolution and adaptive radiation*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

BALDWIN, B. G., & M. J. SANDERSON, 1998. Age and rate of diversification of the Hawaiian silversword alliance (Compositae). *PNAS* **95**: 9402-9406.

BALINSKY, B. I., 1962. Patterns of animal distribution of the African continent. *Annals of the Cape Province Mus* **2**: 299-310.

BAPTESTE, E., & H. PHILIPPE, 2002. The potential value of indels as phylogenetic markers: position of trichomonads as a case study. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 972-977.

BARBER, J. C., J. FRANCISCO-ORTEGA, A. SANTOS-GUERRA, K. G. TURNER, & R. K. JANSEN, 2002. Origin of Macaronesian *Sideritis* L. (Lamioideae: Lamiaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **23**: 293-306.

BARKER, F. K., & F. LUTZONI, 2002. The utility of the Incongruence Length Difference Test. *Syst. Biol.* **51**: 625-637.

BAUM, D. A., R. L. SMALL, & J. F. WENDEL, 1998. Biogeography and floral evolution of Baobabs (*Adansonia*, Bombacaceae) as inferred from multiple data sets. *Syst. Biol.* **47**: 181-207.

BAYER, M. B., 1984. The Cape flora and the karoo - A winter rainfall biome versus a fynbos biome. *Veld & Flora* **70**: 17-19.

BAYER, R. J., & J. R. STARR, 1998. Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the *trnL* intron and *trnL/trnF* spacer. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **85**: 242-256.

BAYER, R. J., D. G. GREBER, & N. H. BAGNALL, 2002. Phylogeny of Australian Gnaphalieae (Asteraceae) based on chloroplast and nuclear sequences, the *trnL* intron, *trnL-trnF* intergenic spacer, *matK*, and ETS. *Syst. Bot.* **27**: 801-814.

BEAUVERD, G., 1938. Une nouvelle Liliacée du Sud-Algérien. *Candollea* **7**: 371-373.

BELAJ, A., Z. SATOVIC, G. CIPRIANI, L. BALDONI, R. TESTOLIN, L. RALLO, & I. TRUJILLO, 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor Appl Genet* **107**: 736-744.

BELL, C. D., & R. W. PATTERSON, 2000. Molecular phylogeny and biogeography of *Linanthus* (Polemoniaceae). *American Journal of Botany* **87**: 1857-1870.

BELLSTEDT, D. U., H. P. LINDER, & E. H. HARLEY, 2001. Phylogenetic relationships in *Disa* based on noncoding *trnL-trnF* chloroplast sequences: evidence of numerous repeat regions. *American Journal of Botany* **88**: 2088-2100.

BENITO, C., A. M. FIGUEIRAS, C. ZARAGOZA, F. J. GALLEGOS, & A. DE LA PEÑA, 1993. Rapid identification of Triticeae genotypes from single seeds using the polymerase chain reaction. *Plant Mol. Biol.* **21**: 181-183.

BENTHAM, G., & J. D. HOOKER, [eds.]. 1883. *Genera Plantarum*. 1258 p.

- BHATTRAMAKKI, D., M. DOLAN, M. HANAFEY, R. WINELAND, D. VASKE, J. C. REGISTER III, S. V. TINGEY, & A. RAFALSKI, 2002. Insertion-deletion polymorphisms in 3' regions of maize genes occur frequently and can be used as highly informative genetic markers. *Plant Mol. Biol.* **48**: 539-547.
- BLÁZQUEZ, M. A., L. N. SOOWAL, I. LEE, & D. WEIGEL, 1997. LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development* **124**: 3835-3844.
- BORTIRI, E., S. H. OH, J. G. JIANG, S. BAGGETT, A. GRANGER, C. WEEKS, M. BUCKINGHAM, D. POTTER, & D. E. PARFITT, 2001. Phylogeny and systematics of *Prunus* (Rosaceae) as determined by sequence analysis of ITS and the chloroplast *trnL-trnF* spacer DNA. *Syst. Bot.* **26**: 797-807.
- BÖHLE, U. R., H. HILGER, R. CERFF, & W. F. MARTIN. 1994. Noncoding chloroplast DNA for plant molecular systematics at the infrageneric level, pp. 391-403. In B. Schierwater, B. Streit, G. P. Wagner, and R. DeSalle [eds.], *Molecular ecology and evolution: approaches and applications*. Birkhäuser Verlag, Basel, Germany.
- BREMER, K., 1992. Ancestral areas: a cladistic reinterpretation of the center of origin concept. *Syst. Biol.* **41**: 436-445.
- BREMER, K., & M. H. G. GUSTAFSSON, 1997. East Gondwana ancestry of the sunflower alliance of families. *PNAS* **94**: 9188-9190.
- BREMER, K., 2000. Early Cretaceous lineages of monocot flowering plants. *PNAS* **97**: 4707-4711.
- BRIDSON, G. D. R., & E. R. SMITH, [eds.]. 1991. *Botanico-Periodicarum-Huntianum, Supplementum*. Pittsburg, USA.
- BROWN, J. H., & M. V. LOMOLINO. 1998. *Dispersalism, pp. Biogeography*. Sinauer Associates, Sunderland.
- BROWN, N. E., [eds.]. 1906. *Kew Bull.* 29.
- BROWN, P. T. H., F. D. LANGE, E. KRANZ, & H. LÖRZ, 1993. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. *Molecular and General Genetics* **237**: 311-317.
- BRUMMITT, R. K., & C. E. POWELL, [eds.]. 1992. *Authors of Plant Names*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- BUCKLEY, T. R., P. ARENSBURGER, C. SIMON, & G. K. CHAMBERS, 2002. Combined data, Bayesian phylogenetic, and the origin of the New Zeland cicada genera. *Syst. Biol.* **51**: 4-18.
- BULL, J. J., J. P. HUELSENBECK, C. W. CUNNINGHAM, D. L. SWOFFORD, & P. J. WADDELL, 1993. Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **42**: 384-397.
- BUSO, G. S. C., P. H. RANGEL, & M. E. FERREIRA, 1998. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Mol. Ecol.* **7**: 107-117.

- BUXBAUM, F., 1936. Die Entwicklungslinien der Lilioideae. I. Die systematische Stellung der Gattung *Gagea*. *Botanisches Archiv* **38**: 305-398.
- CAMIN, J. H., & R. R. SOKAL, 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution* **19**: 311-326.
- CASIVA, P. V., B. O. SAIDMAN, J. C. VILARDI, & A. M. CIALDELLA, 2002. First comparative phenetic studies of Argentinean species of *Acacia* (Fabaceae), using morphometric, isozymal, and RAPD approaches. *American Journal of Botany* **89**: 843-853.
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J. 1995. Ubiquïtat i raresa al·lelica. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona, España.
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J., R. K. JANSEN, J. PEDROLA-MONFORT, & N. MEMBRIVES, 1999. Chloroplast DNA restriction site phylogeny of the genus *Androcymbium* (Colchicaceae). *Syst. Bot.* **24**: 581-597.
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J., R. K. JANSEN, N. MEMBRIVES, J. PEDROLA-MONFORT, J. M. MONTSERRAT, & A. ARDANUY, 2001. Historical biogeography of *Androcymbium* Willd. (Colchicaceae) in Africa: evidence from cpDNA RFPLs. *Bot. J. Linn. Soc.* **136**: 379-392.
- CAVANILLES, A. J., [eds.]. 1801. Icones Et Descriptiones Plantarum Quae Aut Sponte In Hispania Crescunt. Vol 4. Tab. 587-588.
- CAVANILLES, A. J., 1801. De las plantas que el ciudadano Augusto Broussonet colectó en las costas septentrionales de la África y en las islas Canarias. *Anal de Cienc. Natu. Madrid* **3**: 47-71.
- CHANDLER, G. T., R. J. BAYER, & M. D. CRISP, 2001. A molecular phylogeny of the endemic Australian genus *Gastrolobium* (Fabaceae: Mirbelieae) and allied genera using chloroplast and nuclear markers. *American Journal of Botany* **88**: 1675-1687.
- CHASE, M. W., D. E. SOLTIS, & R. G. OLMSTEAD, 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **80**: 528-580.
- CHASE, M. W., M. R. DUVAL, H. G. HILLS, J. G. CONRAN, A. V. COX, L. E. EGUIARTE, J. HARTWELL, M. F. FAY, L. R. CADDICK, K. M. CAMERON, & S. B. HOOT. 1995. Molecular phylogenetics of Liliaceae, pp. 109-137. In P. Rudall, P. J. Cribb, D. F. Cutler, and C. J. Humphries [eds.], *Monocotyledons: systematics and evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, UK.
- CLEGG, M. T., M. P. CUMMINGS, & M. L. DURBIN, 1997. The evolution of plant nuclear genes. *PNAS* **94**: 7791-7798.
- COETZEE, J. A., & J. ROGERS, 1982. Palynological and lithological evidence for the Miocene palaeoenvironment in the saldanha region (South Africa). *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology* **39**: 71-85.
- COLEMAN, M., A. LISTON, J. W. KADEREIT, & R. J. ABBOTT, 2003. Repeat intercontinental dispersal and Pleistocene speciation in disjunct Mediterranean and desert *Senecio* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **90**: 1446-1454.

- COWLING, R. M., & P. M. HOLMES, 1992. Endemism and speciation in a lowland flora from the Cape Floristics Region. *Biological Journal of the Linnean Society* **47**: 367-383.
- COWLING, R. M., D. M. RICHARDSON, & P. J. MUSTART. 1997. Fynbos, pp. 99-130. In R. M. Cowling, D. M. Richardson, and S. M. Pierce [eds.], *Vegetation of Southern Africa*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- CRONN, R. C., R. L. SMALL, T. HASELKORN, & J. F. WENDEL, 2002. Rapid diversification of the cotton genus (*Gossypium*: Malvaceae) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes. *Am. J. Bot.* **89**: 707-725.
- CROW, J. F., & M. KIMURA, [eds.]. 1970. *An introduction to population genetics theory*. Harper & Row, New York.
- CRUDEN, R. W., 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* **31**: 32-36.
- CUÉNOUD, P., M. A. DEL PERO MARTINEZ, P. A. LOIZEAU, R. SPICHIGER, S. ANDREWS, & J. F. MANEN, 2000. Molecular phylogeny and biogeography of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae). *Annals of Botany* **85**: 111-122.
- DAHLGREN, R. M. T., H. T. CLIFFORD, & P. F. YEO, [eds.]. 1985. *The Families of the Monocotyledons: Structure, Evolution and Taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin. 520 p.
- DARLU, P., & G. LECOINTRE, 2002. When does the incongruence length difference test fail? *Mol. Biol. Evol.* **19**: 432-437.
- DE CANDOLLE, A. P. 1805. Colchicaceae, pp. 192-193. In M. M. Lamarck and A. P. d. Candolle [eds.], *Flore française*. Stoupe, Paris, France.
- DE WINTER, B., 1971. Floristic relationships between the northern and southern arid areas in Africa. *Mitt. Bot. Staatsamml. München* **10**: 424-437.
- DEMASURE, B., N. SODZI, & R. J. PETIT, 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* **4**: 129-131.
- DOLPHIN, K., R. BELSHAW, D. L. ORME, & D. QUICKE, 2000. Noise and Incongruence: Interpreting Results of the Incongruence Length Difference Test. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **17**: 401-406.
- DOYLE, J. J., & J. L. DOYLE, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phyt. Bull.* **19**: 11-15.
- DOYLE, J. J., V. KANAZIN, & R. C. SHOEMAKER, 1996. Phylogenetic utility of Histone H3 Intron sequences in the Perennial relatives of Soybean (*Glycyne*: Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**: 438-447.
- DUMINIL, J., M. H. PEMONGE, & R. J. PETIT, 2002. A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes* **2**: 428-430.

- DURAN, E., & G. BARRATE. 1910. *Florae Libycae Prodomus*, pp. Plantae de Tripolitania. Genève.
- DURAND, T., & H. SCHINZ, [eds.]. 1898. *Conspectus Florae Africae*. 412 p.
- EDWARDS, A. W. F., 1970. Estimation of the branch points of a branching diffusion process. *Journal of the Royal Statistical Society* **32**: 155-174.
- EMSHWILLER, E., & J. J. DOYLE, 1999. Chloroplast-Expressed Glutamine Synthetase (ncpGS): Potential Utility for Phylogenetic Studies with an Example from *Oxalis* (Oxalidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **12**: 210-319.
- ENGLER, A., [eds.]. 1889. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*. Pp.: 282. Leipzig.
- ENGLER, A., [eds.]. 1902. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*. Pp: 89.
- ENGLER, A., [eds.]. 1910. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*. Pp: 115.
- ENGLER, A., & K. PRANT, [eds.]. 1930. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. Verlag Wilhelm, Leipzig.
- EVANS, R. C., L. A. ALICE, C. S. CAMPBELL, E. A. KELLOGG, & T. A. DICKINSON, 2000. The Granule-Bound Starch Synthase (GBSSI) Gene in the Rosaceae: Multiple Loci and Phylogenetic Utility. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **17**: 388-400.
- EVANS, R. C., & C. S. CAMPBELL, 2002. The origin of the Apple subfamily (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes. *Am. J. Bot.* **89**: 1478-1484.
- EWENS, W. J., [eds.]. 1979. *Mathematical Population Genetics*. Springer-Verlag, Berlin.
- EXCOFFIER, L., P. E. SMOUSE, & J. M. QUATTRO, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- FARRIS, J. S., M. KÄLLERSJÖ, A. G. KLUGE, & C. BULT, 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**: 315-319.
- FELSENSTEIN, J., 1981. Evolutionary tree from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-378.
- FELSENSTEIN, J., 1984. Distance methods for inferring phylogenies: A justification. *Evolution* **38**: 16-24.
- FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, J. M., & J. L. MARTÍN-ESQUIVEL, [eds.]. 2001. *Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y conservación*. Turquesa, Santa Cruz de Tenerife, España.

- FRANCISCO-ORTEGA, J., J. FUERTES-AGUILAR, S. C. KIM, D. J. CRAWFORD, A. SANTOS-GUERRA, & R. K. JANSEN. 1996. Molecular evidence for the origin, evolution, and dispersal of *Crambe* (Brassicaceae) in the Macaronesian islands. Second Symposium on Fauna and Flora of the Atlantic Islands. Gran Canaria, Canary Islands.
- FRANCISCO-ORTEGA, J., A. SANTOS-GUERRA, A. HINES, & R. K. JANSEN, 1997. Molecular evidence for a Mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **8**: 1595-1613.
- FRANCISCO-ORTEGA, J., L. R. GOERTZEN, A. SANTOS-GUERRA, A. BENABID, & R. K. JANSEN, 1999. Molecular systematics of the *Astericus* alliance (Asteraceae: Inuleae) I: evidence from the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Syst. Bot.* **24**: 249-266.
- FRANCISCO-ORTEGA, J., J. C. BARBER, A. SANTOS-GUERRA, R. FEBLES-HERNANDEZ, & R. K. JANSEN, 2001. Origin and evolution of the endemic genera of Gonosperminae (Asteraceae: Anthemideae) from the Canary Islands: evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* **88**: 161-169.
- FREUDENSTEIN, J. V., & M. W. CHASE, 2004. Analysis of mitochondrial *nad1b-c* intron sequences in Orchidaceae: utility and coding of length-change characters. *Syst. Bot.* **26**: 643-657.
- FRITSCH, P., & L. H. RIESEBERG, 1992. High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature* **359**: 633-636.
- FUKUDA, T., J. YOKOYAMA, & H. OHASHI, 2001. Phylogeny and Biogeography of the Genus *Lycium* (Solanaceae): Inferences from Chloroplast DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**: 246-258.
- FUKUDA, T., J. YOKOYAMA, & H. TSUKAYA, 2003. Phylogenetic relationships among species in the genera *Chisocheton* and *Guarea* that have unique indeterminate leaves as inferred from sequences of chloroplast DNA. *International Journal of Plant Sciences* **164**: 13-24.
- GE, S., A. LI, B. R. LU, S. Z. ZHANG, & Y. D. HONG, 2002. A phylogeny of the rice tribe Oryzoae (Poaceae) based on *matK* sequence data. *American Journal of Botany* **89**: 1967-1972.
- GEYER, C. J. 1991. Markov chain Monte Carlo maximum likelihood, pp. 156-163. In E. M. Keramidas [eds.], *Computing Science and Statistics: Proceedings of the 23rd Symposium on the Interface*. Interface Foundation, Fairfax Station.
- GIELLY, L., & P. TABERLET, 1994. The Use of Chloroplast DNA to resolve plant Phylogenies: Noncoding versus *rcbL* sequences. *Mol. Biol. Evol.* **11**: 769-777.
- GILKS, W. R., S. RICHARDSON, & D. J. SPIEGELHALTER. 1996. Introducing Markov chain Monte Carlo, pp. 1-19. In W. R. Gilks, S. Richardson, and D. J. Spiegelhalter [eds.], *Markov Chain Monte Carlo in Practice*. Chapman & Hall, London.
- GILLHAM, N. W., [eds.]. 1994. *Organelle genes and genomes: transmission and compatibility of organelle genomes*. Oxford University Press, New York.

- GOLDBLATT, P., & J. C. MANNING, 1996. Phylogeny and speciation in *Lapeirousia* subgenus *Lapeirousia* (Iridaceae subfamily Ixioideae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* **83**: 346-361.
- GOLDBLATT, P., 1997. Floristic diversity in the Cape Flora of South Africa. *Biodiversity Conserv.* **6**: 359-377.
- GOLDBLATT, P., & J. MANNING, 2000. Cape Plants. a conspectus of the Cape Flora of South Africa. *Strelitzia* **9**:
- GOLDBLATT, P., V. SAVOLAINEN, O. PORTEOUS, I. SOSTARIC, M. POWELL, G. REEVES, J. C. MANNING, T. G. BARRACLOUGH, & M. W. CHASE, 2002. Radiation in the Cape flora and the phylogeny of peacock irises *Morea* (Iridaceae) based on four plastid DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **25**: 341-360.
- GOTTLIEB, L. D., & V. S. FORD, 1996. Phylogenetic relationships among the sections of *Clarkia* (Onagraceae) inferred from the nucleotide sequences of *PgiC*. *Syst. Bot.* **21**: 45-62.
- GREEN, P. J., 1995. Reversible jump Markov chain Monte Carlo computation and Bayesian model determination. *Biometrika* **82**: 711-732.
- GREUTER, W., 1967. Contributiones floristicae Austro-Aegeae. *Candollea* **22**: 233-253.
- GUSTAFSON, D. J., D. J. GIBSON, & D. L. NICHRENT, 1999. Random amplified polymorphic DNA variation among remnant big bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) populations from Arkansas' Grand Prairie. *Mol. Ecol.* **8**: 1693-1701.
- HALL, T. A., 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment edito and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- HAMILTON, M. B., J. M. BRAVERMAN, & D. F. SORIA-HERRANZ, 2003. Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in new World species of the Lecythydaceae. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 1710-1721.
- HARDIG, T. M., P. S. SOLTIS, & D. E. SOLTIS, 2000. Diversification of the North American shrub genus *Ceanothus* (Rhamnaceae): conflicting phylogenies from nuclear ribosomal DNA and chloroplast DNA. *American Journal of Botany* **87**: 108-123.
- HARTMANN, S., J. D. NASON, & D. BHATTACHARYA, 2002. Phylogenetic origins of *Lophocereus* (Cactaceae) and the senita cactus-senita moth pollination mutualism. *American Journal of Botany* **89**: 1085-1092.
- HASEGAWA, M., H. KISHINO, & T. YANO, 1985. Dating of the huma-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**: 160-174.
- HASTINGS, W. K., 1970. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* **57**: 97-109.
- HELFGOTT, D. M., J. FRANCISCO-ORTEGA, A. SANTOS-GUERRA, R. K. JANSEN, & B. B. SIMPSON, 2000. Biogeography and breeding system evolution of the woody *Bencomia* alliance (Rosaceae) in Macaronesia based on ITS sequence data. *Syst. Bot.* **25**: 82-97.
- HENNIG, W., [eds.]. 1966. Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press, Urbana.

- HIPP, A. L., J. C. HALL, & K. J. SYTSMA, 2004. Congruence versus phylogenetic accuracy: revisiting the incongruence length difference test. *Syst. Biol.* **53**: 81-89.
- HOCHSTETTER, C. F. F., [eds.]. 1851. Plant Abyssinicae, sect. II n° 1338.
- HODGES, S. A., & M. L. ARNOLD, 1995. Spurring plant diversification: are floral nectar spurs a key innovation? *Proceedings of Royal Society of London* **262**: 343-348.
- HOLDREGGER, R., & R. J. ABBOTT, 2003. Phylogeography of the Arctic-Alpine *Saxifraga oppositifolia* (Saxifragaceae) and some related taxa based on cpDNA and ITS sequence variation. *American Journal of Botany* **90**: 931-936.
- HOLSINGER, K. E., 1999. Analysis of genetic diversity in geographically structured populations: a Bayesian perspective. *Hereditas* **130**: 245-255.
- HOLSINGER, K. E., P. O. LEWIS, & D. K. DEY, 2002. A bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Mol. Ecol.* **11**: 1157-1164.
- HOLSINGER, K. E. & P. O. LEWIS, 2003. HICKORY v1.3.
- HOLSINGER, K. E., & L. E. WALLACE, 2004. Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Mol. Ecol.* **13**: 887-894.
- HOWARTH, D. G., & D. A. BAUM, 2002. Phylogenetic utility of a nuclear intron from nitrate reductase for the study of closely related plant species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **23**: 525-528.
- HSÜ, K. J., W. B. F. RYAN, & M. B. CITÁ, 1973. Late Miocene desiccation of the Mediterranean. *Nature* **242**: 240-244.
- HSÜ, K. J., P. MONTARDET, & D. BERNOULLI, 1977. History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature* **267**: 399-403.
- HUELSENBECK, J. P., J. J. BULL, & C. W. CUNNINGHAM, 1996. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 152-158.
- HUELSENBECK, J. P., & B. RANNALA, 1997. Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science* **276**: 227-232.
- HUELSENBECK, J. P., & F. RONQUIST, 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**: 754-755.
- INGRAM, A. L., & J. J. DOYLE, 2003. The origin and evolution of *Eragrostis tef* (Poaceae) and related polyploids: evidence from nuclear *waxy* and plastid *rps 16*. *Am. J. Bot.* **90**: 116-122.
- INGVARSSON, P. K., S. RIBSTEIN, & D. R. TAYLOR, 2003. Molecular Evolution of Insertions and Deletion in the Chloroplast Genome of *Silene*. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 1737-1740.
- ISABEL, N., J. BEAULIEU, P. THÉRIAULT, & J. BOUSQUET, 1999. Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Mol. Ecol.* **8**: 477-483.

- JAIN, S. K. 1990. Variation and selection in plant populations, pp. 199-230. In K. Wöhrmann and S. K. Jain [eds.], Population Biology. Ecological and evolutionary viewpoints. Springer-Verlag, Heidelberg.
- JOHNSON, L. A., & D. E. SOLTIS, 1994. matK DNA Sequences and Phylogenetic Reconstructions in Saxifragaceae s. str. *Syst. Bot.* **19**: 143-156.
- JOHNSON, L. A., & D. E. SOLTIS. 1998. Assessing congruence: empirical examples from molecular data, pp. 297-348. In D. E. Soltis, P. S. Soltis, and J. J. Doyle [eds.], Molecular systematics of plants II: DNA sequencing. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- JORDANO, P., & J. A. GODOY, 2000. RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal-dispersed tree. *Mol. Ecol.* **9**: 1293-1305.
- JÜRGENS, N., 1997. Floristic biodiversity and history of African arid regions. *Biodiversity Conserv.* **6**: 495-514.
- KAWAKITA, A., T. SOTA, J. S. ASCHER, M. ITO, & H. TANAKA, 2003. Evolution and Phylogenetic Utility of alignment Gaps within intron sequences of three nuclear genes in bumble bees (*Bombus*). *Mol. Biol. Evol.* **20**: 87-92.
- KAZAN, K., J. M. MANNERS, & D. F. CAMERON, 1993. Inheritance of random amplified polyorphic DNA markers in an interspecific cross in the genus *Stylosanthes*. *Genome* **36**: 50-56.
- KELCHNER, S. A., & J. F. WENDEL, 1996. Hairpins create minute inversions in non-coding regions of chloroplast DNA. *Current Genetics* **30**: 259-262.
- KELCHNER, S. A., 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **87**: 499-527.
- KIM, S. C., D. J. CRAWFORD, J. FRANCISCO-ORTEGA, & A. SANTOS-GUERRA, 1996. A common origin for woody *Sonchus* and five related genera in the Macaronesian islands: molecular evidence for extensive radiation. *PNAS* **93**: 7743-7748.
- KISHINO, H., J. L. THORNE, & W. J. BRUNO, 2001. Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 352-361.
- KLAK, C., T. A. HEDDERSON, & H. P. LINDER, 2003. A molecular systematic study of the *Lampranthus* group (Aizoaceae) based on the chloroplast *trnT-trnF* and nuclear ITS and 5S NTS sequence data. *Syst. Bot.* **28**: 70-85.
- KOCH, M., B. HAUBOLD, & T. MITCHELL-OLDS, 2001. Molecular systematics of the Brassicaceae: evidence from coding plastidic *matK* and nuclear *chs* sequences. *Am. J. Bot.* **88**: 534-544.
- KOSMAN, E., & K. J. LEONARD, 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Mol. Ecol.* **14**: 415-424.
- KRAUSE, K., 1920. Revision der Gattung *Androcymbium* Willd. *Notizbl. Bot. Gart. Berlin* **7**: 512-526.

- KRESS, W. J., K. J. WURDACK, E. A. ZIMMER, L. A. WEIGT, & D. J. JANZEN, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS* **102**: 8369-8374.
- KUBITZKI, K., [eds.]. 1998. The Families and Genera of Vascular Plants. III Flowering Plants. Monocotyledons: Liliaceae. Springer, Berlin. 478 p.
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I. B., & NEI, M. 2002. MEGA: Molecular Evolutionary Genetic Analysis.
- KUNTH, C. S., [eds.]. 1843. Kunth Enumeratio IV. V. 4.
- KUSUMI, J., Y. TSUMURA, H. YOSHIMARU, & H. TACHIDA, 2000. Phylogenetic relationships in Taxodiaceae and Cupressaceae sensu stricto based on *matK* gene, *chlL* gene, *trnL-trnF* IGS region, and *trnL* intron sequences. *American Journal of Botany* **87**: 1480-1488.
- LAWRENCE, G. H. M., A. F. G. BUCHHEIM, G. S. DANIELS, & H. DOLEZAL, [eds.]. 1968. Botanico-Periodicarum-Huntianum. Pittsburg, USA.
- LAZARO, A., & I. AGUINAGALDE, 1998. Genetic diversity in *Brassica oleracea* L. (Cruciferae) and wild relatives (2n=18) using RAPD markers. *Annals of Botany* **82**: 829-833.
- LEBRUN, J. 1947. La végétation de la plaine alluviale au sud du Lac Edouard. Exploration du Parc National Albert. Institut des Parcs Nationaux du Congo Belge, Bruxelles.
- LEISTNER, O. A., & J. W. MORRIS, 1976. South African place names. *Annals of the Cape Provincial Museums* **12**: 1-565.
- LEVINSON, G., & G. A. GUTMAN, 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 203-221.
- LEWIS, C. E., & J. J. DOYLE, 2001. Phylogenetic Utility of the Nuclear Gene Malate Synthase in the Palm Family (Arecaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**: 409-420.
- LEWIS, C. E., & J. J. DOYLE, 2002. A phylogenetic analysis of tribe Areceae (Arecaceae) using two low-copy nuclear genes. *Plant Syst. Evol.* **236**: 1-17.
- LEWONTIN, R. C., & J. L. HUBBY, 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **54**: 595-609.
- LEWONTIN, R. C., 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* **6**: 381-394.
- LI, H., J. LUO, J. K. KEMPHILL, J. WANG, & J. H. GOULD, 2001. A rapid and high yielding DNA miniprep for Cotton (*Gossypium* spp.). *Plant Mol. Biol. Rep.* **19**: 183a-183e.
- LI, S. 1996. Phylogenetic tree construction using Markov chain Monte Carlo. Ohio State University, Columbus.
- LI, Y. G., C. L. DEWALD, & P. L. SIMS, 1999. Genetic relationships within *Tripsacum* as detected by RAPD variation. *Annals of Botany* **84**: 695-702.

- LIM, S. H., P. C. P. TENG, Y. H. LEE, & C. J. GOH, 1999. RAPD analysis of some species in the genus *Vanda* (Orchidaceae). *Annals of Botany* **83**: 193-196.
- LINDER, H. P. 1985. Gene flow, speciation and species diversity patterns in a species-rich area: The Cape flora., pp. 53-57. In E. S. Vrba [eds.], *Species and Speciation*. Transvaal Museum Monogr. 4, Transvaal Museum, Pretoria.
- LINDER, H. P., & J. H. J. VLOK, 1991. The morphology, taxonomy and evolution of *Rhodocoma* (Restionaceae). *Plant Syst. Evol.* **175**: 139-160.
- LINDER, H. P., M. E. MEADOWS, & R. M. COWLING. 1992. The ecology of Fynbos: Nutrients, fire and diversity, pp. 113-134. In R. M. Cowling [eds.], *History of the Cape Flora*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- LINDER, H. P., J. H. J. VLOK, D. J. MCDONALD, E. G. H. OLIVER, C. BOUCHER, B. E. VAN WYK, & A. SCHUTTE, 1993. The high altitude flora and vegetation of the Cape Floristic Region, South Africa. *Opera Botanica* **121**: 247-261.
- LINDER, H. P., 2003. The radiation of the Cape flora, southern Africa. *Biological Reviews* **78**: 597-638.
- LINDER, H. P., & C. R. HARDY, 2004. Evolution of the species-rich Cape flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **359**: 1623-1632.
- LINNÉ, C., [eds.]. 1764. *Species Plantarum Tomus 1. Editio Tertia*.
- LOO, A. H. B., H. T. W. TAN, P. P. KUMAR, & L. G. SAW, 1999. Population analysis of *Licuala glabra* Griff. var. *glabra* (Palmae) using RAPD profiling. *Annals of Botany* **84**: 421-427.
- LYNCH, M., & B. G. MILLIGAN, 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* **3**: 91-99.
- MAIRE, R., 1934. Contribution à l'étude de la Flore de l'Afrique de Nord. *Bull Soc. Hist. Natur. Afrique de Nord* **25**: 286-326.
- MAKI, M., & S. HORIE, 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal less genetic variation in the endangered plant *Cerastium fischerianum* var. *molle* than in the widespread conspecific *C. fischerianum* var. *fischerianum* (Caryophyllaceae). *Mol. Ecol.* **8**: 145-150.
- MALCOMBER, S. T., 2002. Phylogeny of *Gaertnera* Lam. (Rubiaceae) based on multiple DNA markers: evidence of a rapid radiation in a widespread, morphologically diverse genus. *Evolution* **56**: 42-57.
- MALÉCOT, G., [eds.]. 1948. *Les Mathématiques de l'Hérédité*. Paris.
- MANNING, J., & P. GOLDBLATT, 2001. Notes on African Plants: Colchicaceae. A remarkable new species of *Androcymbium* from Northern Cape, South Africa. *Bothalia* **31**: 203-205.
- MARGELÍ, M. 1995. *Estudis citogenètics en el gènere Androcymbium Willd.* Tesina. Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona.

- MARGELÍ, M., J. PEDROLA-MONFORT, & J. VALLÈS, 1999. Karyological Studies in the Genus *Androcymbium* (Colchicaceae). *Aust. J. Bot.* **47**: 131-146.
- MARTÍN, J., J. PEDROLA, & J. CAUJAPÉ, 1993. Pollen morphology and biometry in *Androcymbium* (Colchicaceae). *Can. J. Bot.* **71**: 1369-1374.
- MASON-GAMER, R. J., & E. A. KELLOGG, 1996. Testing for phylogenetic conflict among molecular data sets in the tribe Triticeae (Gramineae). *Syst. Biol.* **45**: 524-545.
- MASON-GAMER, R. J., C. F. WEIL, & E. A. KELLOGG, 1998. Granule-Bound Starch Syntase: Structure, Function, and Phylogenetic Utility. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 1658-1673.
- MAST, A. R., & T. J. GIVNISH, 2002. Historical Biogeography and the origin of stomatal distributions in *Banksia* and *Dryandra* (Proteaceae) based on their cpDNA phylogeny. *Am. J. Bot.* **89**: 1311-1323.
- MAU, B. 1996. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. University of Wisconsin, Madison.
- MAU, B., & M. A. NEWTON, 1997. Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **6**: 122-131.
- MAU, B., M. A. NEWTON, & B. LARGET, 1999. Bayesian phylogenetic inference via Markov Chain Monte Carlo Methods. *Biometrics* **55**: 1-12.
- MCBRIDE, J. F., 1918. New or otherwise interesting plants, mostly north American Liliaceae and Chenopodiaceae. *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University* **LIII**:
- MEMBRIVES, N. 2000. Biología Evolutiva del género *Androcymbium* (Colchicaceae) a Sudàfrica Occidental. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- MEMBRIVES, N., J. PEDROLA-MONFORT, & J. CAUJAPÉ-CASTELLS, 2001. Relative influence of biological versus historical factors on isozyme variation of the genus *Androcymbium* (Colchicaceae) in Africa. *Plant Syst. Evol.* **229**: 237-260.
- MEMBRIVES, N., J. MARTÍN, J. CAUJAPÉ-CASTELLS, & J. PEDROLA-MONFORT, 2002a. Pollen morphology and biometry of the genus *Androcymbium* (Colchicaceae) in southern Africa: taxonomic and biogeographic considerations. *Bothalia* **32**: 91-96.
- MEMBRIVES, N., J. CAUJAPÉ-CASTELLS, A. ARDANUY, & J. PEDROLA-MONFORT, 2002b. Reproductive biology of the genus *Androcymbium* (Colchicaceae) in western southern Africa. *Orsis* **17**: 37-59.
- MEMBRIVES, N., J. PEDROLA-MONFORT, & J. CAUJAPÉ-CASTELLS, 2003a. Leaf morphology and anatomy of genus *Androcymbium* (Colchicaceae) in Southwest Africa. *Collectanea Botanica* **26**: 83-99.
- MEMBRIVES, N., J. PEDROLA-MONFORT, & J. CAUJAPÉ-CASTELLS, 2003b. Correlations between morphological-anatomical leaf characteristics and enviromental traits in Southwest African species of *Androcymbium* (Colchicaceae). *Bot. Macaronésica* **24**: 73-85.

- MEMBRIVES, N., J. PEDROLA-MONFORT, & J. CAUJAPÉ-CASTELLS, 2003c. Morphological seed studies of southwest African *Androcymbium* (Colchicaceae). *Bot. Macaronésica* **24**: 87-106.
- MES, T. H. M., J. VAN BREDERODE, & H. 'T HART, 1996. Origin of the woody Macaronesian Sempervivoideae and the phylogenetic position of the East African species of *Aeonium*. *Botanica Acta* **109**: 477-491.
- METROPOLIS, N., A. W. ROSENBLUTH, M. N. ROSENBLUTH, A. H. TELLER, & E. TELLER, 1953. Equations of state calculations by fast computing machines. *J. Chem. Phys.* **21**: 1087-1091.
- MILLER, J. T., J. W. GRIMES, D. J. MURPHY, R. J. BAYER, & P. Y. LADIGES, 2003. A phylogenetic analysis of the Acacieae and Ingeae (Mimosoideae: Fabaceae) based on *trnK*, *matk*, *psbA-trnH*, and *trnL/trnF* sequence data. *Syst. Bot.* **28**: 558-566.
- MILTON, S. J., R. I. YEATON, W. R. J. DEAN, & J. H. J. VLOK. 1997. Succulent karoo, pp. 131-166. In R. M. Cowling, D. M. Richardson, and S. M. Pierce [eds.], Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- MIYASHITA, N. T., H. INNAN, & R. TERAUCHI, 1996. Intra and Inter-specific Variation of the Alcohol Dehydrogenase Locus Region in Wild Plants *Arabis gemmifera* and *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 433-436.
- MOGENSEN, H. L., 1996. The hows and ways of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany* **83**: 383-404.
- MONOD, T., 1971. Remarques sur les symétries floristiques des zones sèches Nord et Sud en Afrique. *Mitt. Bot. Staatsamml. München* **10**: 375-423.
- MONTERRAT, J. M., N. MEMBRIVES, J. CAUJAPÉ-CASTELLS, & J. PEDROLA-MONFORT, 2002. Números cromosómicos de algunas especies surafricanas del género *Androcymbium* Willd. (Colchicaceae). *Lagascalia* **22**: 145-151.
- MORTON, B. R., B. S. GAUT, & M. T. CLEGG, 1996. Evolution of alcohol dehydrogenase genes in the Palm and Grass families. *PNAS* **93**: 11735-11739.
- MUELLNER, A. N., R. SAMUEL, S. A. JOHNSON, M. CHEEK, T. D. PENNINGTON, & M. W. CHASE, 2003. Molecular phylogenetics of Meliaceae (Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* **90**: 471-480.
- MUMMENHOFF, K., H. BRÜGGEMANN, & J. L. BOWMAN, 2001. Chloroplast DNA phylogeny and biogeography of *Lepidium* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* **88**: 2051-2063.
- MÜLLER-DOBLIES, U., & D. MÜLLER-DOBLIES, 1984. Zur Kenntnis der Gattung *Androcymbium* (Colchicaceae) im südlichen Afrika: Zwei Synonyma und fünf neue Arten. *Willdenowia* **17**: 179-197.
- MÜLLER-DOBLIES, U., & D. MÜLLER-DOBLIES, 1990. Zur Kenntnis der Gattung *Androcymbium* (Colchicaceae) im südlichen Afrika: 2. *Androcymbium exiguum* hat doch Artwert. *Willdenowia* **19**: 456-470.

- MÜLLER-DOBLIES, U., & D. MÜLLER-DOBLIES, 1998. De Liliifloris Notulae 6. De decuria prima specierum novarum generis *Androcymbium* sect. *Androcymbium* (Colchicaceae) in Africa Australi s.l. Praeterea novitates de huius sectionis nonnullarum specierum distributione (praesertim aucta speciminibus STEllenbosensibus i.a. collectis a botanico vero E. G. H. OLIVERO). *Feddes Repertorium* **109**: 551-572.
- MÜLLER-DOBLIES, U., & D. MÜLLER-DOBLIES, 2002. De Liliifloris Notulae 7. De decuria altera specierum novarum generis *Androcymbium* (Colchicaceae) in Africa Australi s.l. *Feddes Repertorium* **113**: 545-599.
- NEI, M., & J. C. MILLER, 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics* **125**: 873-879.
- NEI, M., & S. KUMAR, [eds.]. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- NEI, M., & W. H. LI, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasis. *PNAS* **76**: 5269-5273.
- NEI, M., [eds.]. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- NEUHAUS, H., & G. LINK, 1987. The chloroplast tRNA Lys (UUU) gene from mustard (*Sinapis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide. *Current Genetics* **11**: 251-257.
- NORDENSTAM, B., 1982. A monograph of the genus *Ornithoglossum* (Liliaceae). *Opera Botanica* **64**:
- NORDENSTAM, B., 1986. The genus *Wurmbea* (Colchicaceae) in the cape region. *Opera Botanica* **87**:
- NORDENSTAM, B. 1998. Colchicaceae, pp. 175-185. In K. Kubitzki [eds.], *The Families and Genera of Vascular Plants III Flowering Plants, Monocotyledons*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- NYFFELER, R., 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnK/matK* and *trnL-trnF* sequences. *American Journal of Botany* **89**: 312-326.
- O'DONNELL, K., 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics* **22**: 213-220.
- OH, S. H., & D. POTTER, 2003. Phylogenetic utility of the second intron of LEAFY in *Neillia* and *Stephanandra* (Rosaceae) and implications for the origin of *Stephanandra*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 203-215.
- OIKI, S., T. KAWAHARA, K. INOUE, M. OHARA, & M. MAKI, 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among populations of the insular endemic plant *Campanula microdonta* (Campanulaceae). *Annals of Botany* **87**: 661-667.

- OLIVER, E. G. H., 2000. Systematics of Ericaceae (Ericaceae: Ericoideae) species with indehiscent and partially dehiscent fruits. *Contributions from the Bolus Herbarium* **19**: 1-486.
- OLMSTEAD, R. G., 1990. Biological and historical factors influencing genetic diversity in the *Scutellaria angustifolia* complex (Labiatae). *Evolution* **44** (1): 54-70.
- OLMSTEAD, R. G., & J. D. PALMER, 1994. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany* **81**: 1205-1224.
- PAGE, R. D. M., & E. C. HOLMES, [eds.]. 1998. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science, Oxford.
- PALAU I VERDERA, A., [eds.]. 1785. *Sistema de los Vegetales o Resumen de la Parte Práctica de Botánica*. Imprenta Real, Madrid.
- PALAU I VERDERA, A., [eds.]. 1785. *Parte Práctica de la Botánica del Caballero C. Linné*. Imprenta Real, Madrid.
- PALMER, A. R., & M. T. HOFFMAN. 1997. Nama-karoo, pp. 167-188. In R. M. Cowling, D. M. Richardson, and S. M. Pierce [eds.], *Vegetation of Southern Africa*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- PALMER, J. D. 1992. Mitochondrial DNA in plant systematics: applications and limitations, pp. 36-49. In P. S. Soltis, D. E. Soltis, and J. J. Doyle [eds.], *Molecular Systematics of Plants*. Chapman & Hall, New York.
- PALMER, J. D., K. L. ADAMS, Y. CHO, C. L. PARKINSON, Y.-L. QIU, & K. SONG, 2000. Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and highly variable mutation rates. *PNAS* **97**: 6960-6966.
- PANERO, J. L., J. FRANCISCO-ORTEGA, R. K. JANSEN, & A. SANTOS-GUERRA, 1999. Molecular evidence for multiple origins of woodiness and a New World biogeographic connection of the Macaronesian Island endemic *Pericallis* (Asteraceae: Senecioneae). *PNAS* **96**: 13886-13891.
- PARTRIDGE, T. C., & R. R. MAUD. 2000. Macro-scale geomorphic evolution of southern Africa., pp. 3-18. In T. C. Partridge and R. R. Maud [eds.], *The Cenozoic of Southern Africa*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- PEDROLA-MONFORT, J. 1993. *Biología poblacional del complejo Androcymbium gramineum secció Erythrosticktus Benth. (Colchicaceae)*. Tesis doctoral. Universitat de Valencia.
- PEDROLA-MONFORT, J., & J. CAUJAPÉ-CASTELLS, 1994. Allozymic and morphological relationships among *Androcymbium gramineum*, *A. europaeum*, and *A. psammophilum* (Colchicaceae). *Plant Syst. Evol.* **191**: 111-126.
- PEDROLA-MONFORT, J., & J. CAUJAPÉ-CASTELLS, 1996. Genetic and morphological divergence in the *Androcymbium gramineum* complex (Colchicaceae). *Plant Syst. Evol.* **201**: 149-162.
- PEDROLA-MONFORT, J., & J. CAUJAPÉ-CASTELLS, 1998. The *Androcymbium* species of the Canary Islands. *Curti's Botanical Magazine* **15**: 67-77.

- PEDROLA-MONFORT, J., N. MEMBRIVES, & J. M. MONTSERRAT, 1999a. Two new *Androcymbia* (Colchicaceae) from western South Africa. *Fontqueria* **54**: 7-9.
- PEDROLA-MONFORT, J., N. MEMBRIVES, J. M. MONTSERRAT, & J. CAUJAPÉ-CASTELLS, 1999b. A new species from the western of South Africa: *Androcymbium huntleyi* (Colchicaceae). *Fontqueria* **53**: 1-2.
- PEDROLA-MONFORT, J., N. MEMBRIVES, J. M. MONTSERRAT, & J. CAUJAPÉ-CASTELLS, 2003. Systematic relationships of some species of the genus *Androcymbium* Willd. (Colchicaceae) in western South Africa. *Bot. Macaronésica* **24**: 107-126.
- PENNER, G. A., A. BUSH, R. WISE, W. KIM, L. DOMIER, K. KASHA, A. LAROCHE, G. SCOLES, S. J. MOLNAR, & G. FEDAK, 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Applied* **2**: 341-345.
- PERRET, M., A. CHAUTEMS, R. SPICHIGER, G. KITE, & V. SAVOLAINEN, 2003. Systematics and Evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): evidence from phylogenetic analyses of sic plastid DNA regions and Nuclear ncpGS. *Am. J. Bot.* **90**: 445-460.
- PERSSON, K., 1993. Reproductive strategies and evolution in *Colchicum*. *Proceedings of the 5th Optima meetings* 394-414.
- PETERSEN, G., & O. SEBERG, 2002. Molecular Evolution and Phylogenetic Application of DMC1. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **22**: 43-50.
- PETERSEN, G., & O. SEBERG, 2003. Phylogenetic analyses of the diploid species of *Hordeum* (Poaceae) and a revised classification of the genus. *Syst. Bot.* **28**: 293-306.
- PETERSEN, G., & O. SEBERG, 2004. On the origin of the Tetraploid species *Hordeum capense* and *H. secalinum* (Poaceae). *Syst. Bot.* **29**: 862-873.
- POSADA, D., & K. A. CRANDALL, 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818.
- PRESL, K. B., [eds.]. 1844. *Botanische Bemerkungen*.
- QUÉZEL, P., 1978. Analysis of the flora of Mediterranean and Saharan Africa. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **65**: 479-534.
- RANNALA, B., & Z. YANG, 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* **43**: 304-311.
- RAUNKIAER, C., [eds.]. 1934. *The life forms of plants and statistical plant geography*. Oxford University Press, Oxford.
- REEVES, G., M. W. CHASE, P. GOLDBLATT, P. RUDALL, M. F. FAY, A. V. COX, B. LEJEUNE, & T. SOUZA-CHIES, 2001. Molecular systematics of Iridaceae: evidence from four plastid DNA regions. *Am. J. Bot.* **88**: 2074-2087.
- REID, C. 1993. Monocotyledons (excl. Poaceae), pp. T. H. Arnold and B. C. De Wet [eds.], *Plants of Southern Africa: names and distribution*. Mem. Bot. Surv. S. Afr. **62**.

- REIFENBERGER, U., 1990. *Androcymbium hierrense* Santos ssp. *macrospermum* Reifenberger ssp. nov. (Liliaceae), ein neuer Endemit der Insel La Gomera. *Viera* **18**: 251-259.
- RENNER, S. S., & L. ZHANG, 2004. Biogeography of the *Pistia* clade (Araceae): Based on chloroplast and mitochondrial DNA sequences and bayesian divergence time inference. *Syst. Biol.* **53**: 422-432.
- RICHARDS, A. J., [eds.]. 1986. Plant Breeding Systems. 1^a Part. George Allen & Unwin, London.
- RICHARDSON, J. E., F. M. WEITZ, M. F. FAY, Q. C. B. CRONK, H. P. LINDER, G. REEVES, & M. W. CHASE, 2001. Rapid and recent origin of species richness in the Cape flora of South Africa. *Nature* **412**: 181-183.
- RICHARDSON, J. E., R. T. PENNINGTON, T. D. PENNINGTON, & P. M. HOLLINGSWORTH, 2001. Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees. *Science* **293**: 2242-2245.
- RIESEBERG, L. H., 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol. Ecol.* **5**: 99-103.
- ROEDER, K., M. ESCOBAR, J. KADANE, & I. BALAZS, 1998. Measuring heterogeneity in forensic databases using hierarchical Bayes models. *Biometrika* **85**: 269-287.
- ROEMER, J. J., & J. A. SCHULTER, [eds.]. 1830. Systema Vegetabilium. Ed. Nova. Vol VII. 1528 p.
- ROESSLER, H., 1974. Die Gattung *Androcymbium* Willd. (Liliaceae) in Südwestafrika. *Mitt. Bot. München* **11**: 545-566.
- RONQUIST, F. 1996. DIVA version 1.1. Computer program and manual available by anonymous FTP from Uppsala University (ftp.uu.se or ftp.systbot.uu.se).
- RONQUIST, F., 1997. Dispersal-vicariance analysis: A new biogeographic approach to the quantification of historical biogeography. *Syst. Biol.* **46**: 195-203.
- RONQUIST, F., HUELSENBECK, J. P., & VAN DER MARK, P. 2005. MrBayes 3.1 Manual.
- RUDALL, P., C. A. FURNESS, M. W. CHASE, & M. F. FAY, 1997. Microsporogenesis and pollen sulcus type in Asparagales (Liliana). *Can. J. Bot.* **75**: 408-430.
- RUTSCHMANN, F. 2004. Bayesian molecular dating using PAML/multidivtime. A step-by-step manual. University of Zurich, Switzerland. Available at <http://www.plant.ch>.
- RYDING, O., 1998. Phylogeny of the *Leucas* group (Lamiaceae). *Syst. Bot.* **23**: 235-247.
- SAID, R., [eds.]. 1981. Geological Evolution of the River Nile. Springer Verlag, New York.
- SAID, R., [eds.]. 1993. The Nile River: geology, hidrology and utilization. Pergamon Press, Oxford.
- SAMUEL, R., T. F. STUESSY, K. TREMETSBERGER, C. M. BAEZA, & S. SILJAK-YAKOVLEV, 2003. Phylogenetic relationships among species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Cichorieae) based

on ITS, plastid *trnL* intron, *trnL-F* spacer, and *matK* sequences. *American Journal of Botany* **90**: 494-507.

SANDERSON, M. J., 1997. A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 1218-1231.

SANG, T., M. J. DONOGHUE, & D. ZHANG, 1997a. Evolution of Alcohol Dehydrogenase Genes in Peonies (*Paeonia*): Phylogenetic Relationships of Putative Nonhybrid Species. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 994-1007.

SANG, T., D. J. CRAWFORD, & T. F. STUESSY, 1997b. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* **84**: 1120-1136.

SANG, T., 2002. Utility of Low-Copy Nuclear Gene Sequences in Plant Phylogenetics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* **37**: 121-147.

SANGER, F., S. NICKLEN, & A. R. COULSON, 1977. DNA sequencing with chain determination inhibitors. *PNAS* **74**: 5463-5467.

SANJUR, O. I., D. R. PIPERNO, T. C. ANDRES, & L. WESSEL-BEAVER, 2002. Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: implications for crop plant evolution and areas origin. *PNAS* **99**: 535-540.

SANTOS-GUERRA, A. 1977. *Androcymbium hierrensis* spec. nova para la flora canaria, pp. 53-59. In II Congreso Internacional. pro Flora Macaronésica. Ed. Funchal.

SANTOS-GUERRA, A., [eds.]. 1980. Contribución al conocimiento de la flora y vegetación de la isla de El Hierro (I. Canarias). Ed. Fundación Juan March, Serie Universitaria, Madrid.

SANTOS-GUERRA, A. 2001. Flora Vasculare Nativa, pp. 185-192. In J. M. Fernández-Palacios and J. L. Martín-Esquível [eds.], *Naturaleza de las Islas Canarias: Ecología y Conservación*. Publicaciones Turquesa, Santa Cruz de Tenerife, España.

SCHINZ, H. 1896. Kenntnis der Afrikanischen Flora, pp. Bulletin de l'herbier Boissier. Tome IV. N°6.

SCHIRE, B. D., M. LAVIN, N. P. BARKER, & H. CORTES-BURNS. 2003. Towards a phylogeny of *Indigofera* (Leguminosae-Papilionoideae): identification of major clades and relative ages., pp. 269-302. In B. B. Klitgaard and A. Bruneau [eds.], *Advances in legume systematics, part 10. Higher level systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

SCHLECHTENDAL, D. F. L., 1826. Ueber die Melianthaceen am Vorgebrige der guten Hoffnung. *Linnaea* **1**: 78-95.

SCHNEIDER, S., ROESSLI, D., & EXCOFFIER, L. 2000. ARLEQUIN: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Lab, Department of Anthropology and Ecology, University of Geneva. Geneva.

SCHÖNENBERGER, J., & E. CONTI, 2003. Molecular phylogeny and floral evolution of the Penaeaceae, Oliniaceae, Rhynchocalycaceae, and Alzateaceae (Myrtales). *American Journal of Botany* **90**: 293-309.

- SCHÖNLAND, S., 1904. New and little known plants. *Rec. Albany Museum* **1**: 123-124.
- SCHREBERO, C. D., [eds.]. 1787. *Amoenitates Academicae Volumen II. Editio Tertia.*
- SCHREBERO, C. D., [eds.]. 1789. *Amoenitates Academicae Volumen IV. Editio Secunda.*
- SEGARRA-MORAGUES, J. G., M. PALOP-ESTEBAN, F. GONZÁLEZ-CANDELAS, & P. CATALÁN, 2005. On the verge of extinction: genetics of the critically endangered Iberian plant species, *Borderea chouardii* (Dioscoreaceae) and implications for conservation management. *Mol. Ecol.* **14**: 969-982.
- SHAW, J., E. B. LICKEY, J. T. BECK, S. B. FARMER, W. LIU, J. MILLER, K. C. SIRIPUN, C. T. WINDER, E. E. SCHILLING, & R. L. SMALL, 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* **92**: 142-166.
- SHIMODAIRA, H., & M. HASEGAWA, 1999. Multiple comparasions of Log-Likelihoods with Applications to Phylogenetic Inference. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1114-1116.
- SIESSER, W. G. 1978. Aridification of the Namib desert: evidence from oceanic cores, pp. 105-113. In E. M. van Zinderen Bakker [eds.], *Antarctic Glacial History and World Palaeoenvironments.* Balkema, Rotterdam.
- SIMMONS, M. P., & H. OCHOTERENA, 2000. Gaps as Characters in Sequence-Based Phylogenetic Analyses. *Syst. Biol.* **49(2)**: 369-381.
- SMALL, R. L., J. A. RYBURN, R. C. CRONN, T. SEELANAN, & J. F. WENDEL, 1998. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogenetic reconstruction in a recently diverged plant group. *Am. J. Bot.* **85**: 1301-1315.
- SNIJMAN, D. 1984. The genus *Aemanthus*. A revision. *Journal of South African Botany*, vol. 12.
- SOLTIS, D. E., R. K. KUZOFF, M. E. MORT, M. J. ZANIS, M. FISHBEIN, L. HUFFORD, J. KOONTZ, & M. K. ORROYO, 2001. Elucidating deep-level phylogenetic relationships in Saxifragaceae using sequences for six chloroplastic and nuclear DNA regions. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **88**: 669-693.
- SORANZO, N., J. PROVAN, & W. POWELL, 1999. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* **42**: 158-161.
- SPIEGELHALTER, D. J., N. G. BEST, B. P. CARLIN, & A. VAN DER LINDE, 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society B* **17**: 37-49.
- STAFLEU, F. A., & R. S. COWAN, [eds.]. 1976. *Taxonomic Literature. Vol. I-VII Ed. II.*
- STAFLEU, F. A., & E. A. MENNEGA, [eds.]. 1992. *Taxonomic Literature, Supplementum II.*
- STECH, M., D. QUANDT, & W. FREY, 2003. Molecular circumscription of the hornworts (Anthocerotophyta) based on the chloroplast DNA *trnL-trnF* region. *Journal of Plant Research* **116**: 389-398.

- SVENTENIUS, E. R. 1960. Additamentum ad floram Canariensem. Agronomiarum Investigationem Nationale Hispanicum Institutum. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- SWOFFORD, D. L. & BEGLE, D. P. 1993. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, ver. 3.1. user's manual. Illinois Natural History Survey. Champaign, Illinois.
- SWOFFORD, D. L. 2003. Phylogenetic Analysis Using Parsimony, PAUP*. Sinauer. Sunderland, MA.
- SYTSMA, K. J., 1990. DNA and morphology: Inference of plant phylogeny. *Trends in Ecology and Evolution* **5**: 104-110.
- TABERLET, P., L. GIELLY, G. PAUTOU, & J. BOUVET, 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* **17**: 1105-1109.
- TAJIMA, F., 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* **105**: 437-460.
- TATE, J. A., & B. B. SIMPSON, 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Syst. Bot.* **28**: 723-737.
- THIESELTON-DYER, W. T. 1896. Haemodoraceae to Liliaceae. W. T. Thieselton-Dyer [eds.], Flora Capensis. Vol. IV. Royal Gardens, Kew, UK.
- THIV, M., L. STRUWE, & J. W. KADEREIT, 1999. The phylogenetic relationships and evolution of the Canarian laurel forest endemic *Ixanthus viscosus* (Aiton) Griseb. (Gentianaceae): evidence from matK and ITS sequences, and floral morphology and anatomy. *Plant Syst. Evol.* **218**: 299-317.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, & T. J. GIBON, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- THORMANN, C. E., & T. C. OSBORN. 1993. Use of RAPD and RFLP markers for germplasm evaluation., pp. 9-11. In M. Neff [eds.], Application of RAPD Technology to Plant Breeding. ASHS Publishers, St. Paul, Minnesota.
- THORNE, J. L., H. KISHINO, & I. S. PAINTER, 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 1647-1657.
- THORNE, J. L., & H. KISHINO, 2002. Divergence time estimation and rate evolution with multilocus data set. *Syst. Biol.* **51**: 689-702.
- THORNE, R. F. 2000. The classification and geography of the angiosperm subclasses Alismatide, Liliidae, and Commelinidae: Monocotyledoneae (Liliidae), pp. 75-124. In B. Nordenstam, G. El-Ghazaly, M. Kassas, and T. C. Laurent [eds.], Plant systematics for the 21st century. Portland Press, London, UK.
- THORNTON, J. W., & R. DESALLE, 2000. A new method to localize and test the significance of incongruence: Detecting domain shuffling in the nuclear receptor superfamily. *Syst. Biol.* **49**: 183-201.

- THULIN, M. 1994. Aspects of disjunct distributions and edemism in the arid parts of the Horn of Africa, particularly Somalia, pp. 1105-1119. In J. H. Seyani and A. C. Chikuni [eds.], Proceedings of the 13th. Plenary Meetings AETFAT. Zomba, Malawi.
- TOMARU, N., M. TAKAHASHI, Y. TSUMURA, & K. OHBA, 1998. Intraspecific variation and phylogeographic patterns of *Fagus crenata* (Fagaceae) mitochondrial DNA. *American Journal of Botany* **85**: 629-636.
- TYSON, P. D., [eds.]. 1986. Climatic Change and Variability in southern Africa. Oxford University Press, Cape Town.
- VAN DER MERWE, M. M., A. E. VAN WYK, & A. M. BOTHA, 2005. Molecular phylogenetic analysis of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern African taxa. *Plant Syst. Evol.* **251**: 21-34.
- VAN HAM, R. C. H. J., H. THART, T. H. M. MES, & J. M. SANDBRINK, 1994. Molecular evolution of noncoding regions of the chloroplast genome in the Crassulaceae and related species. *Current Genetics* **25**: 558-566.
- VAN NOORDWIJK, A. J. 1990. The methods of genetical ecology applied to the study of evolutionary change, pp. 291-320. In K. Wöhrmann and S. K. Jain [eds.], Population Biology. Ecological and Evolutionary viewpoints. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- VAN ZINDEREN BAKKER, E. M., 1969. The "arid corridor" between south-western Africa and the Horn of Africa. *Palaeoecology of Africa* **4**: 139-140.
- VAN ZINDEREN BAKKER, E. M., 1975. The Origin and Palaeoenvironment of the Namib Desert Biome. *Journal of Biogeography* **2**: 65-73.
- VERBOOM, G. A., H. P. LINDER, & W. D. STOCK, 2003. Phylogenetic of the grass genus *Ehrharta*: evidence for radiation in the summer-arid zones of the South African Cape. *Evolution* **57**: 1008-1021.
- VERDCOURT, B., 1969. The arid corridor between the north-east and south-west areas of Africa. *Palaeoecology of Africa* **4**: 140-144.
- VINNERSTEN, A., & K. BREMER, 2001. Age and Biogeography of Major Clades in Liliales. *Am. J. Bot.* **88**: 1695-1703.
- VINNERSTEN, A., & G. REEVES, 2003. Phylogenetic relationships within Colchicaceae. *Am. J. Bot.* **90**: 1455-1462.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER, & M. ZABEAU, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* **23**: 4407-4414.
- WANG, X. R., Y. TSUMURA, H. YOSHIMARU, K. NAGASAKA, & A. E. SZMIDT, 1999. Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcl*, *matK*, *rpL20-rpS18* spacer, and *trnV* intron sequences. *American Journal of Botany* **86**: 1742-1753.
- WEISING, K., H. NYBOM, K. WOLFF, & W. MEYER, [eds.]. 1995. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- WIENS, J. J., 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. *Syst. Biol.* **47**: 568-581.
- WILDMAN, W. C., & B. A. PURSEY, 1968. Colchicina and related compounds. *Alkaloids* **11**: 407-457.
- WILLDENOW, F., [eds.]. 1799. Caroli a Linné. Species Plantarum. Tomus II. Editio Quarta.
- WILLDENOW, F., 1808. Nähere Bastimmung einiger Lliengewächse besonders aber derjenigen, die zur sechsten Klasse und dritten Ordnung des Linnéschen Systems gehören. *Ges. Naturforsch. Freunde Berlin Magazine* **2**: 14-30.
- WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI, & S. V. TINGEY, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6231-6235.
- WILLKOM, M., & J. LANGE, [eds.]. 1870. Prodrum Flora Hispanicae. Stuttgartiae, Stuttgart.
- WOLFE, A. D., & A. LISTON. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology, pp. 43-86. In D. E. Soltis, P. S. Soltis, and J. J. Doyle [eds.], Plant Molecular Systematics II. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- WRIGHT, S., 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**: 323-354.
- YAMANE, K., Y. YASUI, & O. OHNISHI, 2003. Intraspecific dpDNA variations of diploid and tetraploid perennial buckwheat, *Fagopyrum cymosum* (Polygonaceae). *American Journal of Botany* **90**: 339-346.
- YANG, Z., 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *CABIOS* **13**: 555-556.
- YEH, F., YANG, R., & BOYLE, T. 1997. POPGENE v.1.32. Molecular Biology and Technology Centre, University of Alberta. Canada.
- YODER, A. D., & Z. YANG, 2000. Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 1081-1090.
- YODER, A. D., J. A. IRWIN, & B. A. PAYSEUR, 2001. Failure of the ILD to determine data combinability for slow loris phylogeny. *Syst. Biol.* **50**: 408-424.
- YOUNG, N. D., & J. HEALY, 2003. Gapcoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics* **4**:
- ZHIVOTOVSKY, L. A., 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Mol. Ecol.* **8**: 907-913.
- ZUCKERKANDL, E., & L. PAULING. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins, pp. V. Bryson and H. J. Vogel [eds.], *Evolving Genes and Proteins*. Academic, New York.
- ZWICKL, D. J., & D. M. HILLIS, 2002. Increased Taxon Sampling Greatly Reduces Phylogenetic Error. *Syst. Biol.* **51**: 588-598.

Anexos

Anexo 1: tabla de los tiempos geológicos. Valores en millones de años

ERA	PERIODO	ÉPOCA	EDAD		
CENOZOICO	CUATERNARIO	HOLOCENO	Postglaciar		
		PLEISTOCENO	Versiliense	0,01	
			Tirreniense	0,08	
			Siciliense	0,12	
			Calabriense	0,35	
			1,75		
	NEÓGENO	PLIOCENO	Piacenziense	3,4	
			Zancliense	5,3	
		MIOCENO	Messiniense	7,3	
			Tortonense	11	
			Serravalliense	14,3	
			Lanhiense	15,8	
			Burdigaliense	20,3	
			Aquitaniense	23,5	
			OLIGOCENO	Chatiense	28
				Rupeliense	33,7
	EOCENO	Priaboniense		37	
		Bartoniense	40		
		Luteciense	46		
		Ypresiense	53		
		PALEOCENO	Thanetiense	57,9	
	Selandiense		60,9		
	Daniense		65		

Anexo 2: códigos de las secuencias depositadas en el GenBank. ID: idem; Hap.: haplotipo.

ESPECIE	HAPLOTIPO	NÚMERO DE REGISTRO GENBANK								
		<i>trn L intrón</i>	<i>trn L-trn F IGS</i>	<i>trn Y-trn D IGS</i>	<i>trn H-psb A IGS</i>	<i>RNApol 2_i23</i>	<i>trn T-trn L IGS</i>	<i>cox 3</i>	<i>ccmF2</i>	<i>nad 1_i2</i>
Norte de África										
<i>A. gramineum</i>	1	AY608517	AY608520	AY608528	DQ088292	DQ088326	DQ 091221	DQ091226	DQ091224	
<i>A. gramineum</i>	2	AY608516	AY608521	AY608529	DQ088293	DQ088327		ID Hap.1	ID Hap.1	
<i>A. hierrense</i>		AY608514	AY608523	AY608531	DQ088296	DQ088329				
<i>A. palaestinum</i>		AY136755	AY608527	AY608534	DQ088307	DQ088330				
<i>A. psammophilum</i>		AY136756	AY608524	AY608532	DQ088310	DQ088331				
<i>A. rechingeri</i>		AY608518	AY608525	AY608535	DQ088311	DQ088332				
<i>A. wyssianum</i>	1	AY608519	AY608526	AY608533	DQ088316	DQ088333				
<i>A. wyssianum</i>	2	AY608515	AY608522	AY608530	DQ088317	DQ088328				
Surafrika occidental										
<i>A. albanense</i> subsp. <i>clanwilliamense</i>		AY622747	AY622708	AY611748	DQ 088278	DQ088348				
<i>A. austrocapense</i>	2	ID Hap.1	ID Hap.1	AY611741	DQ088280	DQ088341				
<i>A. bellum</i>		AY622738	AY622700	AY611742	DQ088281	DQ088342				
<i>A. burchellii</i> subsp. <i>burchellii</i>		AY622739	AY622701	AY611743	DQ088282	ID Hap.1				
<i>A. burchellii</i> subsp. <i>pulchrum</i>	1	AY622740	AY622702	AY611744	DQ088283	DQ088343				
<i>A. burchellii</i> subsp. <i>pulchrum</i>	2	AY622741	ID Hap.1	ID Hap.1	ID Hap.1	ID Hap.1				
<i>A. capense</i>		AY622742	AY622703	AY611745	DQ088284	DQ088344				
<i>A. ciliolatum</i>		AY622743	AY622704	AY611746	DQ088285	DQ088345				
<i>A. circinatum</i>	1	AY622744	AY622705	AY611747	DQ088286	DQ088346				
<i>A. circinatum</i>	2	AY622745	AY622706	ID Hap.1	DQ088287	DQ088347				
<i>A. cuspidatum</i>		AY622746	AY622707	AY611749	DQ088288	DQ088349				
<i>A. dregei</i>		AY622748	AY622709	AY611750	DQ088290	DQ088350		DQ091228	DQ091223	DQ091230
<i>A. eghimocymbion</i>		AY622749	AY622710	AY611751	DQ088291	DQ088351				
<i>A. hantamense</i>		AY622750	AY622711	AY611752	DQ088294	DQ088352				
<i>A. henssenianum</i>		AY622751	AY622712	AY611753	DQ088295	DQ088353				
<i>A. huntleyi</i>	1	AY622752	AY622713	AY611754	DQ088297	DQ088354				
<i>A. huntleyi</i>	2	ID Hap.1	ID Hap.1	ID Hap.1	DQ088298	ID Hap.1				

Anexo 2: (cont.)

ESPECIE	HAPLOTIPO	NÚMERO DE REGISTRO GENBANK								
		<i>trn</i> L intrón	<i>trn</i> L- <i>trn</i> F IGS	<i>trn</i> Y- <i>trn</i> D IGS	<i>trn</i> H- <i>psb</i> A IGS	<i>RNApol</i> 2_ <i>i23</i>	<i>trn</i> T- <i>trn</i> L IGS	<i>cox</i> 3	<i>ccmF</i> 2	<i>nad</i> 1_ <i>i2</i>
<i>A. irroratum</i>	1	AY622753	AY622714	AY611755	DQ088299	DQ088355				
<i>A. irroratum</i>	2	AY622754	AY622715	AY611756	DQ088300	ID Hap.1				
<i>A. irroratum</i>	3	ID Hap.2	ID Hap.2	ID Hap.2	DQ088301	ID Hap.1				
<i>A. irroratum</i>	4	AY622755	AY622716	ID Hap.2	DQ088302	ID Hap.1				
<i>A. irroratum</i>	5	ID Hap.4	ID Hap.4	ID Hap.4	DQ088303	ID Hap.1				
<i>A. poeltianum</i>	1	AY622756	AY622717	AY611757	DQ088308	DQ088356				
<i>A. poeltianum</i>	2	AY622757	AY622718	AY611758	DQ088309	DQ088357				
<i>A. villosum</i>		AY622758	AY622719	AY611759	DQ088314	DQ088358				
<i>A. walteri</i>		AY622759	AY622720	AY611760	DQ088315	DQ088359				
Surafrika Oriental										
<i>A. albanense</i> subsp. <i>albanense</i>		AY622733	AY622695	AY611765	DQ088277	DQ088334				
<i>A. austrocapense</i>	1	AY136757	AY622696	AY611766	DQ088279	DQ088335	DQ091222			
<i>A. decipiens</i>		AY622734	AY622697	AY611767	DQ088289	-				
<i>A. leisteri</i>	1	AY622735	AY622698	AY611768	DQ088304	DQ088336				
<i>A. leisteri</i>	2	AY622736	ID Hap.1	AY611769	ID Hap.1	ID Hap.1				
<i>A. longipes</i>		AY622737	AY622699	AY611770	DQ088305	DQ088337				
Namibia										
<i>A. asteroides</i>		AY622731	AY622693	AY611762	DQ088312	DQ088340				
<i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	1	AY622732	AY622694	AY611763	DQ088306	DQ088338	DQ091227	DQ091225	DQ091229	
<i>A. melanthioides</i> subsp. <i>melanthioides</i>	2	ID Hap.1	ID Hap.1	AY611764	ID Hap.1	ID Hap.1	ID Hap.1	ID Hap.1	ID Hap.1	
<i>A. roseum</i>		AY622730	AY622692	AY611761	DQ088313	DQ088339				
Grupos externos										
<i>Merendera montana</i>		AY154477	AY622724	AY622770	DQ088324	DQ088361				
<i>Merendera filifolia</i>		AY622760	AY622726	AY622771	DQ088323	-				
<i>Merendera androcymbioides</i>		AY622761	AY622725	AY622772	DQ088322	-				
<i>Colchicum lusitanum</i>		AY154475	AY622722	AY622768	DQ088320	DQ088363				
<i>Bulbocodium vernum</i>		AY622763	AY622727	AY622767	DQ088319	-				
<i>Baeometra uniflora</i>		AY155494	AY622729	AY622769	DQ088318	DQ088362				
<i>Onixotis triquetra</i>		AY622762	AY622723	AY622765	DQ088325	-				
<i>Gloriosa superba</i>		AY154476	AY622721	AY622766	DQ088321	DQ088360				
<i>Alstroemeria aurantiaca</i>		AY622764	AY622728	AY622773	DQ088276	DQ088364				

Anexo 3: matriz de secuencias alineadas utilizada para la filogenia molecular.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
A. palaestium	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC								
A. gramineum Hap1	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. gramineum Hap2	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. wyssianum Hap2	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. hierrense	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. psammophilum	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. rechingeri	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. wyssianum Hap1	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. roseum	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. asteroides	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. albanense ssp albanense	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. longipes	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. leistneri Hap1	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. leistneri Hap2	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. decipiens	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. austrocapense Hap1	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. austrocapense Hap2	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. irroratum Hap1	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. irroratum Hap2	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. irroratum Hap3	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. irroratum Hap4	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. irroratum Hap5	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. albanense ssp clanwilliamen	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. hantamense	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. burchellii ssp burchellii	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A burchellii ssp pulchrum Hap1	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A burchellii ssp pulchrum Hap2	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. capense	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. ciliolatum	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. circinatum Hap1	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. circinatum Hap2	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. villosum	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. hensseniaum	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. eghimocymbion	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. walteri	GACTTGATTACATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. poeltianum Hap1	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. poeltianum Hap2	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. bellum	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. huntleyi Hap 1	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. huntleyi Hap 2	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. cuspidatum	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. dregei	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. melanthioides Hap1	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
A. melanthioides Hap2	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
Colchicum lusitanum	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
Merendera montana	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
Merendera androcymbioides	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
Merendera filifolia	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
Bulbocodium venum	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
Baeometra uniflora	GACTTGAGTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
Onixotis stricta	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
Gloriosa superba	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									
Alstroemeria aurantiaca	GACTTGATTAGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC									

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
A. palaestium	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. gramineum Hap1	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. gramineum Hap2	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. wyssianum Hap2	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. hierrense	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. psammophilum	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. rechingeri	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. wyssianum Hap1	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. roseum	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. asteroides	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. albanense ssp albanense	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. longipes	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. leistneri Hap1	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. leistneri Hap2	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. decipiens	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. austrocapense Hap1	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. austrocapense Hap2	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. irroratum Hap1	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. irroratum Hap2	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. irroratum Hap3	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. irroratum Hap4	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. irroratum Hap5	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. albanense ssp clanwilliamen	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. hantamense	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. burchellii ssp burchellii	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A burchellii ssp pulchrum Hap1	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A burchellii ssp pulchrum Hap2	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. capense	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. ciliolatum	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. circinatum Hap1	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. circinatum Hap2	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. villosum	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTAGTAG							
A. hensseniaum	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. eghimocymbion	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. walteri	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTAGTAG							
A. poeltianum Hap1	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTAGTAG							
A. poeltianum Hap2	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. bellum	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. huntleyi Hap 1	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. huntleyi Hap 2	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. cuspidatum	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. dregei	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. melanthioides Hap1	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
A. melanthioides Hap2	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
Colchicum lusitanum	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
Merendera montana	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
Merendera androcymbioides	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
Merendera filifolia	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
Bulbocodium venum	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
Baeometra uniflora	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
Onixotis stricta	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
Gloriosa superba	TTTATGTT	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACGTTGACTACGTTGCGTTGGTAG							
Alstroemeria aurantiaca	TCTTTTTTTTATTATTTTAA	-----	AAGAAAACAAAGGATAGGTGCAGAGACTCGATGGAAGCTGTTCTAACGAATGGAATTGGCGTTGACTACGTTGCATTGGTAG							

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
A. palaestium	CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACTCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. gramineum Hap1		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACTCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. gramineum Hap2		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACTCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. wyssianum Hap2		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACTCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. hierrense		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACTCTATATGCGTATACATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. psammophilum		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACTCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. rechingeri		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACTCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. wyssianum Hap1		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACTCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. roseum		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACTCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. asteroides		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. albanense ssp albanense		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACA	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. longipes		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACA	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. leistneri Hap1		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGGCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. leistneri Hap2		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. decipiens		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. austrocapense Hap1		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. austrocapense Hap2		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAAAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. irroratum Hap1		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. irroratum Hap2		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. irroratum Hap3		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. irroratum Hap4		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. irroratum Hap5		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. albanense ssp clanwilliamen		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. hantamense		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. burchellii ssp burchellii		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A burchellii ssp pulchrum Hap1		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A burchellii ssp pulchrum Hap2		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. capense		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. ciliolatum		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. circinatum Hap1		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. circinatum Hap2		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. villosum		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. hensseniaum		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGGCATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCAA						
A. eghimocymbion		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAGCG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. walteri		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. poeltianum Hap1		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. poeltianum Hap2		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. bellum		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. huntleyi Hap 1		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACGATTAATGATTAATCACAACCTCGA							
A. huntleyi Hap 2		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACGATTAATGATTAATCACAACCTCGA							
A. cuspidatum		CTG - AATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. dregei		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. melanthioides Hap1		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
A. melanthioides Hap2		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
Colchicum lusitanum		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
Merendera montana		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
Merendera androcymbioides		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
Merendera filifolia		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
Bulbocodium venum		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
Baeometra uniflora		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
Onixotis stricta		CTGGAATCCCTCTATCAAATTACAGAAA	---GGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCGA						
Gloriosa superba		CTGGAATCCCTCTATCGAAATTACAGAAA	GAAGGATGACCCCTATATGCGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCACAACCTCAA						
Alstroemeria aurantiaca		TTGGAATCCCTCTATTGAAATTAGAGAAA	---GGATGACCCCTATGTACGTATATATACATACTGACATATCAAACG	-----ATTAATCAGACTCGA						

	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
A. palaestium	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGTTTCATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG						
A. gramineum Hap1	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. gramineum Hap2	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. wyssianum Hap2	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. hierrense	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. psammophilum	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. rechingeri	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. wyssianum Hap1	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. roseum	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. asteroides	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. albanense ssp albanense	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. longipes	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. leistneri Hap1	ATGCGCAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. leistneri Hap2	ATGCGCAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. decipiens	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGTTTCATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. austrocapense Hap1	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. austrocapense Hap2	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. irroratum Hap1	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAGCATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. irroratum Hap2	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTGGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. irroratum Hap3	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. irroratum Hap4	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. irroratum Hap5	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. albanense ssp clanwilliamen	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. hantamense	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. burchellii ssp burchellii	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A burchellii ssp pulchrum Hap1	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A burchellii ssp pulchrum Hap2	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. capense	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. ciliolatum	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGTTTCATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. circinatum Hap1	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. circinatum Hap2	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. villosum	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. hensseniaum	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. eghimocymbion	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGTTTCATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. walteri	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. poeltianum Hap1	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGTTTCATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. poeltianum Hap2	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. bellum	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. huntleyi Hap 1	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTGAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATAAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. huntleyi Hap 2	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTGAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATAAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. cuspidatum	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGTTTCATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. dregei	ATGCACAGAAATCTTTGAATTTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGAGAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. melanthioides Hap1	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
A. melanthioides Hap2	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
Colchicum lusitanum	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
Merendera montana	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
Merendera androcymbioides	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGTTTCATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
Merendera filifolia	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
Bulbocodium vernum	ATGCACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGTTTCATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
Baeometra uniflora	GTGTACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGCACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
Onixotis stricta	GTGTACAGAAATCTTTGAATCTTATCTTAATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC	----	CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG							
Gloriosa superba	GTGTACAGAAATCTTTGAATCTTA-----ATCCTAAGTTCCTTTGGATAGATACC-----CCTACAAATGAACATTTGTAGGTAAGGAATTCCTGTTATTG									
Alstroemeria aurantiaca	GTGAACAGAAATCTTTGGATCTTA-----ATCCTAAGTTCCTTCGGGCAGATATGATACCCTTAGAAATGAACATATGT-GGTAAGGAATCCC-ATTATTG									

	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
A. palaestium	TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. gramineum Hap1		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. gramineum Hap2		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. wyssianum Hap2		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. hierrense		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. psammophilum		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. rechingeri		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. wyssianum Hap1		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. roseum		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAGAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. asteroides		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. albanense ssp albanense		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. longipes		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. leistneri Hap1		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. leistneri Hap2		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. decipiens		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. austrocapense Hap1		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. austrocapense Hap2		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. irroratum Hap1		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. irroratum Hap2		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. irroratum Hap3		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. irroratum Hap4		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. irroratum Hap5		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. albanense ssp clanwilliamen		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. hantamense		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. burchellii ssp burchellii		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A burchellii ssp pulchrum Hap1		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A burchellii ssp pulchrum Hap2		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. capense		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. ciliolatum		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. circinatum Hap1		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. circinatum Hap2		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. villosum		--CTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. hensseniaum		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. eghimocymbion		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTACAGTCCCATATCTAT					
A. walteri		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. poeltianum Hap1		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. poeltianum Hap2		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. bellum		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. huntleyi Hap 1		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. huntleyi Hap 2		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. cuspidatum		TTCTCGTTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTAGAGTCCCATATCTAT					
A. dregei		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
A. melanthioides Hap1		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGCCCATATCTAT					
A. melanthioides Hap2		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAATAAATAAAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT						
Colchicum lusitanum		TTCTCATT	-----AAAT	---AAAGAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
Merendera montana		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCTAAAAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCCAT					
Merendera androcymbioides		T-CTCATT	-----ATCTATCGAAAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
Merendera filifolia		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGAAAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
Bulbocodium vernum		TTCTCATT	-----ATCTATCGAAAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
Baeometra uniflora		--ATCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATTGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTTTGGAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
Onixotis stricta		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCCAT					
Gloriosa superba		TTCTCATTGAAAGA	---TTCATTATCTATCGACAAT	---AAAAAAA	---CCACGAGATTCCTAGTAACCTGTATCACTCTTACTATAGTCCCATATCTAT					
Alstroemeria aurantiaca		TTCCATTGAAAGCTATCCATTTTCTTTTGGCAAT	---AAA-AAA	---CCACG	---GCTTACTAGTAATCTGTGCCACTCTCACTATAGTACATATCTAT					

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
A. palaestium ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. gramineum Hap1 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. gramineum Hap2 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. wyssianum Hap2 ----CACCCACTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. hierrense ----CACCCACTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. psammophilum ----CACCCACTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. rechingeri ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. wyssianum Hap1 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. roseum ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. asteroides ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. albanense ssp albanense ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACRGTYGAAGGCATCACACC
A. longipes ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACRGTYGAAGGCATCACACC
A. leistneri Hap1 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACAGTYGAAGGCATCACACC
A. leistneri Hap2 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACAGTYGAAGGCATCACACC
A. decipiens ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. austrocapense Hap1 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACAGTYGAAGGCATCACACC
A. austrocapense Hap2 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACRGTYGAAGGCATCACACC
A. irroratum Hap1 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. irroratum Hap2 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. irroratum Hap3 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. irroratum Hap4 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. irroratum Hap5 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. albanense ssp clanwilliamen ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. hantamense ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. burchellii ssp burchellii ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A burchellii ssp pulchrum Hap1 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A burchellii ssp pulchrum Hap2 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. capense ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. ciliolatum ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACAGTCGAAGGCATCACACC
A. circinatum Hap1 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. circinatum Hap2 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACRGTYGAAGGCATCACACC
A. villosum ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACRGTKGAAGGMATCACACC
A. hensseniaum ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. eghimocymbion ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. walteri ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTTAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. poeltianum Hap1 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTTAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. poeltianum Hap2 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTTAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. bellum ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTTAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. huntleyi Hap 1 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTTAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. huntleyi Hap 2 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTTAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. cuspidatum ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. dregei ----CAACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACAGTTGAAGGCATCACACC
A. melanthioides Hap1 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
A. melanthioides Hap2 ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTTAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
Colchicum lusitanum ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
Merendera montana ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
Merendera androcymbioides ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
Merendera filifolia ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
Bulbocodium vernum ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
Baeometra uniflora CATAACCCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
Onixotis stricta ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
Gloriosa superba ----CACCCGCTGGGATTGTAGTTCAATCGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC
Alstroemeria aurantiaca ----CGCCTCGCCGGGATTGTAGTTCAATCGGTTAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGAGGATATGCCATGGACGGTTGAAGGCATCACACC

	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200
A. palaestium	TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. gramineum Hap1		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGTACGAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. gramineum Hap2		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGTACGAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. wyssianum Hap2		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTATTT	-TTT	--	CTTGG			
A. hierrense		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGGAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTATTT	-TTT	--	CTTGG			
A. psammophilum		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTATTT	-TTT	--	CTTGG			
A. rechingeri		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. wyssianum Hap1		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATGCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTATTT	-TTT	--	CTTGG			
A. roseum		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. asteroides		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. albanense ssp albanense		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. longipes		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. leistneri Hap1		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. leistneri Hap2		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. decipiens		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. austrocapense Hap1		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. austrocapense Hap2		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. irroratum Hap1		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	CTTGG			
A. irroratum Hap2		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. irroratum Hap3		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. irroratum Hap4		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. irroratum Hap5		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. albanense ssp clanwilliamen		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTCCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. hantamense		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. burchellii ssp burchellii		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A burchellii ssp pulchrum Hap1		TAAGACTTCTGTT	--	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A burchellii ssp pulchrum Hap2		TAAGACTTCTGTT	--	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. capense		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGACTCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. ciliolatum		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. circinatum Hap1		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. circinatum Hap2		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. villosum		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. hensseniaum		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. eghimocymbion		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGGAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. walteri		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. poeltianum Hap1		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAAGCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. poeltianum Hap2		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. bellum		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. huntleyi Hap 1		TAAGACTTCT	----	GTCTTATTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. huntleyi Hap 2		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. cuspidatum		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. dregei		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGAAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. melanthioides Hap1		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
A. melanthioides Hap2		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
Colchicum lusitanum		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
Merendera montana		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
Merendera androcymbioides		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCTTTT	-TTT	--	GTTGG			
Merendera filifolia		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
Bulbocodium vernum		TAAGACTTTT	---	CGGTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCTTGCTAGCAAGAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
Baeometra uniflora		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTCTATACAAATCGTTGAAGGAGCAATACTAAACCTCCTGCTAGCAGGAGGTTTAGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
Onixotis stricta		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTCCTAGCAGGAGGTTTGGTATTGATCTTTT	-TTT	--	GTTGG			
Gloriosa superba		TAAGACATCT	----	GTCTTAGTGTATACGAATCGTTGAAGGAGCAATACCAAACCTACTCCTAGCAGTAGGTTTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	--	GTTGG			
Alstroemeria aurantiaca		TAAGACTTCT	----	GTCTTAGTGTATATGAATGTTGAAGGGGCAATACCAAATTTCTTATTAGCAAGGGATTGGTATTGCTCCCTT	-TTT	-----				

	3010	3020	3030
		
A. palaestium	0-00--00-00000--000000001000011-010010		
A. gramineum Hap1	011---00-0-000--00-000001000011-010010		
A. gramineum Hap2	011---00-0-000--00-000001000011-010010		
A. wyssianum Hap2	011---00-0-000--00-000001000011-010011		
A. hierrense	011---00-0-000--00-000001000011-010011		
A. psammophilum	011---00-0-000--00-000001000011-010011		
A. rechingeri	011---00-0-000--00-000001000011-010010		
A. wyssianum Hap1	011---00-0-000--00-000001000011-010011		
A. roseum	01000100-00000--000000001000011-010010		
A. asteroides	0101--00-00000--000000001000011-010010		
A. albanense ssp albanense	011---00-0-000--00-000001000011-010010		
A. longipes	011---00-0-000--00-000001000011-010010		
A. leistneri Hap1	011---00-0-000--00-000001000011-010010		
A. leistneri Hap2	011---00-0-000--00-000001000011-010010		
A. decipiens	011---00-0-000--00-000001000011-010010		
A. austrocapense Hap1	011---00-0-000--00-000001000011-010010		
A. austrocapense Hap2	011---00-0-000--00-000001000011-010010		
A. irroratum Hap1	01001010-0-000--00-000001000011-010010		
A. irroratum Hap2	0100100000000000000010-001--011-010010		
A. irroratum Hap3	0100100000000000000010-001--011-010010		
A. irroratum Hap4	010010000000000000001-0-001--011-010010		
A. irroratum Hap5	0100100000000000000001-0-000011-010010		
A. albanense ssp clanwilliamen	0100100000000101----0-0001-011-010010		
A. hantamense	0100100000---1-----0-0001-011-010010		
A. burchellii ssp burchellii	0100100000---1-----0-0001-011-010010		
A burchellii ssp pulchrum Hap1	0100100000---1-----0-0001-011-010010		
A burchellii ssp pulchrum Hap2	0100100000---1-----0-0001-011-010010		
A. capense	0100100000---1-----0-0001-001-010010		
A. ciliolatum	0100100000---1-----0-0001-011-010010		
A. circinatum Hap1	0100100000---1-----0-0001-011-010010		
A. circinatum Hap2	0100100000---1-----0-0001-011-010010		
A. villosum	0100100000---1-----0-0001-011-010010		
A. hensseniaum	01001001-----0-00001--110000		
A. eghimocymbion	0100100000---1-----0-0001-011-010010		
A. walteri	0100100000--10--0--000-01000011-010010		
A. poeltianum Hap1	0100100000--10--0--000-01000011-010010		
A. poeltinaum Hap2	0100100000--10--0--000-01000011-010010		
A. bellum	0100100000--10--0--000-01000011-010010		
A. huntleyi Hap 1	01001000100000--01-000001000011-010100		
A. huntleyi Hap 2	0100100000--10--0--000-01000011-010010		
A. cuspidatum	1-----0-0--00--00-000001000011-010010		
A. dregei	0100100001-----0-000011-000010		
A. melanthioides Hap1	0100100000-100--00-000001000011-010010		
A. melanthioides Hap2	0100100000-100--00-000001000011-010010		
Colchicum lusitanum	0100100000-100--00-000101000011-010010		
Merendera montana	0100100000-100--00-000101000011-010010		
Merendera androcymbioides	0100100000-100--00-000101000011-010010		
Merendera filifolia	011---00-0-000--00-000001000011-010010		
Bulbocodium vernum	0100100000-100--00-000101000011-010010		
Baeometra uniflora	0000100000---1-----0-000011-1-010010		
Onixotis stricta	00001000001000--00-000001000011-010010		
Gloriosa superba	010010000000000100100001----0101010010		
Alstroemeria aurantiaca	0-0---00-0-000--00-0000010000100011010		