

2013

ANÁLISIS BIOGEOGRÁFICO DE LAS ESPECIES SUDAFRICANAS  
DEL GÉNERO *ANTHOXANTHUM* L.



ALBA RODRÍGUEZ DÍEZ

TRABAJO DE FIN DE GRADO: BIOLOGÍA

# ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	3
o Situación taxonómica del género <i>Anthoxanthum</i> en la F. Poaceae.	
o Morfología del género <i>Anthoxanthum</i> .	
o Distribución y composición del género.	
o Objetivos.	
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
o Material vegetal y aislamiento del ADN.	
o Amplificación y secuenciación del ADN.	
o Alineamiento de las secuencias y análisis filogenéticos.	
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
o Árboles filogenéticos.	
o Especies Africanas de <i>Anthoxanthum</i> . Sección <i>Anthoxanthum</i> .	
o Especies Africanas de <i>Anthoxanthum</i> . Sección <i>Ataxia</i> .	
o Conservación.	
5. BIBLIOGRAFÍA.....	18
6. ANEXO I.....	21

## RESUMEN

En este estudio se llevó a cabo el análisis filogenético y biogeográfico del género *Anthoxanthum* L. Se pretende analizar los procesos históricos responsables de la distribución de las especies del género, haciendo especial hincapié en los taxa sudafricanos y su diversidad genética. Para ello, se analizan regiones de ADN cloroplástico y nuclear obtenidas de 148 muestras representando 15 especies del género. De los especímenes analizados, 95 pertenecen a 17 poblaciones naturales de las especies sudafricanas (+Madagascar) del género *Anthoxanthum dregeanum*, *A. tongo*, *A. ecklonii* e *A. madagascariense*. Estas cuatro especies habitan en áreas montañosas de Sudáfrica con clima mediterráneo a subtropical situadas en el Cabo Occidental (*A. dregeanum* y *A. tongo*), en la cordillera de los Drakensberg (*A. ecklonii*) y el centro de Madagascar.

Para la consecución de los objetivos, las secuencias obtenidas se analizarán mediante métodos de máxima parsimonia e inferencia bayesiana para estudiar las relaciones filogenéticas entre 15 de las 18-22 especies de *Anthoxanthum*. Dichas relaciones se representarán mediante árboles filogenéticos. Nuestro estudio muestra que las especies capenses (+ *A. madagascariensis*) forman un grupo monofilético emparentado con el clado asiático de *Anthoxanthum*. También se observa que el continente africano ha sido colonizado por *Anthoxanthum* cuando menos dos veces. En una primera colonización antecesores asiáticos dieron lugar a las especies sudafricanas. En un evento independiente de colonización, antecesores euroasiáticos dieron lugar a las especies del E de África.

## INTRODUCCIÓN

*Anthoxanthum* L. es un género de plantas vasculares perteneciente a la familia Poaceae (gramíneas) compuesto por entre 18 y 22 especies (Pimentel et al., 2007).

El género fue descrito por Linneo y publicado en *Species Plantarum* en 1753. Su nombre deriva de las palabras griegas *anthos* (flor) y *xanthos* (amarillo), en referencia al color de la panícula después de la floración. Dentro de *Anthoxanthum* se distinguen especies anuales y perennes, muchas de las cuales muestran una gran variación en sus niveles de ploidía.

### *Situación taxonómica del género Anthoxanthum en la F. Poaceae*

Tradicionalmente, el género *Anthoxanthum* se ha incluido dentro de la tribu Phalaridae, junto con los géneros *Phalaris* L. y *Hierochloë* R.Br. (Soreng & Davis, 2000; GPWG, 2001). Los miembros de esta tribu de gramíneas tienen en común que las espiguillas están constituidas por tres flores, la superior siempre hermafrodita con dos estambres, y las dos inferiores con distintos niveles de reducción de sus piezas florales (Schouten & Veldkamp, 1985). Si bien la proximidad entre los géneros *Anthoxanthum* y *Hierochloë*

ha sido demostrada mediante métodos moleculares (Quintanar et al., 2007), la Tribu Phalaridae no resultó monofilética, por lo que en la actualidad se la tiende a considerar monogénica (incluyendo únicamente *Phalaris*) mientras que *Anthoxanthum* e *Hierochloë* se incluyen en la Subtribu Anthoxanthinae dentro de la Supertribu Aveneae-Poeae (Quintanar et al., 2007). La diferenciación entre *Anthoxanthum* y *Hierochloë* se establece en base a la estructura floral. *Anthoxanthum* presenta dos flores inferiores estériles y, a menudo, reducidas a lemas. *Hierochloë*, sin embargo, tiene dos flores inferiores masculinas con 3 estambres cada una. Entre ambos géneros existen, sin embargo, formas intermedias, lo que ha llevado a distintos autores a proponer su fusión (Connor, 2012). *Anthoxanthum* e *Hierochloë* comparten además altas concentraciones de un compuesto aromático llamado cumarina, pero se diferencian en su número básico de cromosomas, siendo 5 para *Anthoxanthum* y 7 para *Hierochloë*. Dentro de *Anthoxanthum* se distinguen dos secciones en base a su morfología floral, sección *Anthoxanthum* y sección *Ataxia*. La sección *Anthoxanthum* comprende 9-10 especies anuales y perennes, y presenta una gran diversidad en su nivel de ploidía y morfología. La sección *Ataxia* contiene entre 7 y 10 especies cuyas características no han sido muy estudiadas.

#### *Morfología del género Anthoxanthum*

El género *Anthoxanthum* está formado por plantas herbáceas anuales o perennes, que se caracterizan por sus hojas planas y envainantes, con lígulas membranosas, truncadas o en punta, pero nunca reducidas a una línea de pelos. Los individuos, que pueden ser glabros o pilosos, presentan inflorescencias en forma de panícula condensada que amarillea tras la floración. La inflorescencia presenta numerosas espiguillas comprimidas lateralmente, que contienen, en la sección *Anthoxanthum*, (Fig. 1) una sola flor fértil acompañada de dos rudimentos estériles, concretamente las lemas de flores degeneradas, normalmente pubescentes por el dorso aristado y de mayor tamaño que la fértil. Las glumas son muy desiguales, carenadas y mucronadas. La inferior es más corta y uninervia, mientras que la superior es más larga que las flores y trinervada. La lema y la pálea de la flor fértil son pequeñas, membranosas y glabras, mientras que en las estériles son pilosas y aristadas; en ambas, la lema superior siempre presenta una robusta arista que surge por encima de la base. La flor fértil, que carece de lodículas, presenta dos estambres y un estigma dividido, largo y plumoso (pubescente),

rasgo característico de la panícula de *Anthoxanthum*. La cariósida es glabra, brillante, oval y no canaliculada (Tutin, 1980).



Figura 1.- Esquema de inflorescencia y espiguilla de *A. amarum* (sección *Anthoxanthum*). Dibujo de D. Romero.

La sección *Ataxia* se caracteriza porque las flores inferiores de la espiguilla pueden ser tanto estériles como masculinas, existiendo una gran variación entre las especies y, a veces, dentro de una misma especie. Así, entre las especies Africanas *A. ecklonii* y *A. madagascariense* tienen las flores inferiores vacías en la madurez, semejantes a la sección *Anthoxanthum* (si bien se pueden apreciar flores abortadas al inicio de su desarrollo). Por el contrario, *A. tongo* y *A. dregeanum* son andromonoicos, produciendo flores hermafroditas y masculinas en la misma planta, con la flor inferior normalmente masculina y la intermedia, masculina (*A. dregeanum*) o estéril (*A. tongo*) (Connor, 2012).

Morfológicamente, la sección *Ataxia* representa un estado intermedio entre la sección *Anthoxanthum* y el género *Hierochlœe* (Fig. 2) por lo que se ha sugerido el carácter híbrido de esta sección (Schouten & Veldkamp, 1985).



Figura 2. Espiguillas de (A) *Hierochloë*, (B) Sección *Ataxia* y (C) Sección *Anthoxanthum*. (1) Gluma inferior; (2) gluma superior; (3) arista; (4) flor fértil; (5) flor masculina; (6) flor estéril vacía reducida a lema; (7) flor estéril con pálea.

La existencia de estas formas intermedias llevó a Schouten & Veldkamp (1985) a reunir ambos géneros bajo la denominación de *Anthoxanthum s. lat.* (incluye a *Hierchloë* R. Br.). Este criterio ha sido seguido en numerosas floras.

#### *Distribución y composición del género*

Las especies del género *Anthoxanthum* son nativas del Viejo Mundo, si bien algunas especies han sido introducidas en América y Australia. El género se distribuye principalmente en regiones templado-boreales de Europa, Asia y África, aunque presenta también disyunciones en zonas de alta montaña tropical africanas y del SE Asiático. La distribución de las secciones es claramente diferente. La sección *Anthoxanthum* abarca regiones templadas y ártico-alpinas del norte de Europa, el Mediterráneo, Macaronesia, y el Este de África (Clayton, 1970) y la sección *Ataxia* está distribuida por el sur de África (incluyendo Madagascar) y el este de Asia (área sur de Japón-Himalaya-Nueva Guinea).

En general se incluyen alrededor de 18 especies en el género, si bien el número exacto de taxa es todavía una fuente de controversia (Pimentel et al., 2007). El grupo de especies más analizado es el complejo poliploide que se distribuye por Europa boreal y templada, compuesto por las especies *A. odoratum* L. (4x) y *A. alpinum* Löve & Löve (2x). Otras especies son *A. amarum* Brot. (18x), endémico del NW de la Península Ibérica, las diploides mediterráneas *A. gracile* Biv., *A. aristatum* Boiss. y *A. ovatum*

Lag. y las macaronésicas *A. maderense* Teppner y una especie aún no caracterizada de las Islas Canarias.

Este trabajo se centra a las especies Africanas y Asiáticas de *Anthoxanthum*, de las que existen menos datos. Entre las primeras, *A. nivale* K.Schum es endémica de las Montañas del E de África, mientras que *A. ecklonii* (Nees ex. Trin) Stapf. se encuentra dividida en dos núcleos de población, uno en Malawi y otro en el extremo sur-este de África (Fig. 3). *Anthoxanthum dregeanum* (Trin) Stapf. y *A. tongo* (Trin) Stapf., endémicas del Cabo Occidental y *A. madagascariense* Stapf. es endémica de la zona central de Madagascar. Todas las especies Sudafricanas de *Anthoxanthum* (incluyendo Madagascar) habitan en zonas de montaña, en cotas más altas en las zonas de clima tropical o subtropical (Madagascar y SE de Sudáfrica).

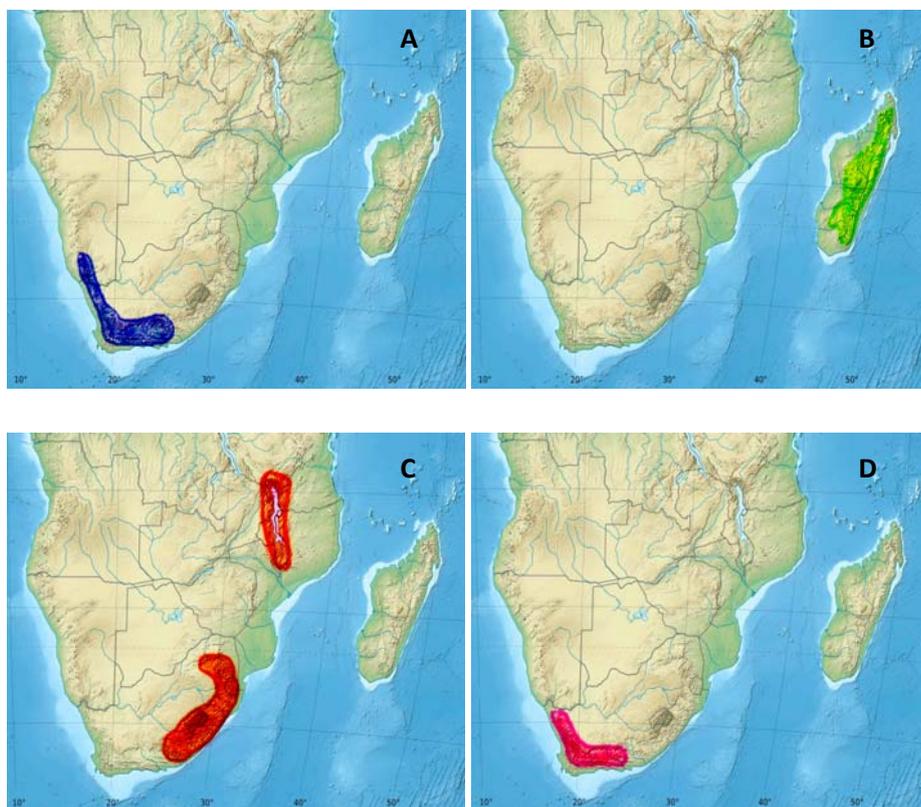


Figura 3. Distribución de (A) *A. dregeanum*, (B) *A. madagascariense*, (C) *A. ecklonii*, (D) *A. tongo*.

Entre las especies Asiáticas, para este estudio se consiguieron muestras de *A. hookeri* Rendle, *A. horsfieldii* (Kunth) Mez y *A. angustum* (Hitchc.) Ohwi. Todas ellas habitan en montañas del SE de Asia.

*Objetivos*

Los principales objetivos de este trabajo fueron: (i) establecer las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Anthoxanthum*; (ii) analizar la posición filogenética de las especies africanas del género, así como su diversidad genética y (iii) establecer una hipótesis sobre el origen biogeográfico de las especies africanas de *Anthoxanthum*, tanto de las secciones *Ataxia* como *Anthoxanthum*. Para la consecución de estos objetivos se emplearán técnicas de análisis filogenético Bayesiano y de máxima parsimonia sobre secuencias del ADN cloroplástico y nuclear.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Material vegetal y aislamiento del ADN*

Para la obtención de las secuencias se extrajo ADN tanto de hojas frescas como de hojas recogidas en las poblaciones naturales entre los años 2009 y 2012 (Anexo 1), y que estaban disponibles en el Área de Botánica de la Facultad de Ciencias conservadas en sílica gel. La extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo del método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) (Doyle & Doyle, 1987). Es un procedimiento especialmente indicado para eliminar los polisacáridos y los compuestos polifenólicos, que, de otro modo, alterarían la pureza del ADN y, por tanto, su calidad. La primera etapa consiste en la lisis de la membrana celular y nuclear, para lo cual la muestra se trata con el tampón de extracción CTAB, un detergente que captura los lípidos de la membrana celular. En la segunda fase se consigue desnaturalizar las proteínas con la ayuda de cloroformo. Por último, se separan los ácidos nucleicos y se tratan con etanol para una mayor purificación. Tras la extracción, la cuantificación del ADN obtenido se realizó en un gel de agarosa al 1,5% y utilizando el Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

### *Amplificación y secuenciación del ADN*

Se escogieron 2 regiones de ADN, una nuclear (ETS) y una plástica (*trnLF*), por su alta variabilidad en plantas (Taberlet et al., 1991; Gillespie et al., 2009). El uso combinado de regiones plásticas y nucleares es especialmente útil en el estudio de grupos donde la evolución reticulada es frecuente, como las Poaceae. Para la amplificación del espaciador intergénico *trnLF* se emplearon los primers de Taberlet et al. (1991) y el protocolo de Torrecilla et al. (2003). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con la siguiente mezcla de reacción (25 µl): 2,5 µl 10 x PCR Buffer; 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl dNTP (10 mM), 2,5 µl BSA (1 %), 0,5 µl Primer *forward* y Primer *reverse* (10 µM), 0,5 *Taq polymerase* (5U/ µl) y 1 µl ADN (50 ng/µl). El programa de la PCR fue: un paso de desnaturalización del ADN a 95°C durante 10 min seguido de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización de 30 segundos a 95°C, una fase de annealing de 30 segundos a 50°C y una extensión de 2 minutos a 72°C. Finalmente se realizó una extensión adicional de 5 minutos a 72°C.

En la amplificación de la región nuclear ribosomal multicopia ETS (*External Transcribed Spacer*) se siguió el protocolo y se utilizaron los primers de Gillespie et al. (2009). La mezcla de reacción (15 µl) fue: 1,5 µl 10 x PCR Buffer; 0,9 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,3 µl dNTP (10 mM), 0,38 µl Primer *forward* y Primer *reverse* (10 µM), 0,06 *Taq polymerase* (5U/ µl) y 1,5 µl ADN (50 ng/µl). El programa de la PCR fue: un paso de desnaturalización del ADN a 95°C durante 1 min seguido de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización de 45 segundos a 95°C, una fase de annealing de 45 segundos a 58°C y una extensión de 90 segundos a 72°C. Finalmente se realizó una extensión adicional de 5 minutos a 72°C. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *MyCycler* (Bio-Rad, Hercules, California, USA)

El resultado de la amplificación se comprobó mediante un gel de agarosa al 1,5%. Los amplicones positivos se purificaron mediante la mezcla de enzimas ExoSap (Affymetrix, Santa Clara, California, USA). La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador 3130xl de Applied Biosystems (Foster City, California, USA) a través de la empresa MacroGen Europe (Amsterdam, Holanda).

#### *Alineamiento de las secuencias y análisis filogenéticos*

Las secuencias *forward* y *reverse* fueron ensambladas y editadas usando el programa CodonCode Aligner v. 4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA), el mismo con el que más adelante se alineó todo el conjunto de secuencias para cada región amplificada. Posteriormente, las regiones de ADN fueron alineadas usando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), puesto en práctica mediante el programa Sea View v. 4 (Gouy *et al.*, 2010). Las secuencias se editaron manualmente cuando fue necesario para mejorar el alineamiento, mediante la adición o supresión de gaps usando el programa MEGA v. 5 (Kumar *et. al.*, 2001). El alineamiento generado se guardó con formato *fasta*.

Se usaron dos aproximaciones filogenéticas distintas para evaluar las relaciones filogenéticas: criterio de máxima parsimonia e inferencia Bayesiana. En ambos métodos se usaron las secuencias de *Hierochlōe* como grupo externo, dado que este taxón tiene una relación filogenética cercana con *Anthoxanthum*. El archivo de entrada para los programas de análisis filogenético se preparó mediante el programa Mesquite v. 2.75 (Maddison & Maddison, 2011).

El análisis de máxima parsimonia no requiere el establecimiento de *priors* (asunciones *a priori* referidos al modo de evolución de la secuencia), y se basa en el criterio de que el árbol filogenético más probable es aquel que requiere un menor número de cambios nucleotídicos. Este análisis se realizó a través del programa PAUP v. 4 (Swofford, 2000). Los gaps del alineamiento no se tuvieron en cuenta y se les dio el mismo peso a todos los caracteres del alineamiento. El modo menos elaborado de identificar el árbol más parsimonioso consiste en contar el número de pasos que contiene cada uno de los árboles posibles y quedarse con el que tenga menor puntuación. Pero dado que esto solamente es posible para un número relativamente pequeño de secuencias o especies, se realizó una búsqueda heurística con 1000 réplicas aleatorias de secuencia aditiva (*random addition sequence replicates*), utilizando la permutación de ramas tipo TBR (*tree bisection and reconnection*). Asimismo se utilizó el algoritmo “branch and bound” para aumentar la eficiencia de búsquedas de soluciones cuasi-óptimas (Peña, 2011). Adicionalmente, la consistencia de nodos del árbol de máxima parsimonia fue estimada por la técnica de bootstrapping con 1000 réplicas.

El análisis de inferencia bayesiana se llevó a cabo mediante el programa MrBayes v. 3.0b4 (Ronquist & Huelsenbeck, 2005). El análisis Bayesiano emplea el algoritmo de las Cadenas de Markov y Monte Carlo (MCMC) para estimar la probabilidad *a posteriori* de los distintos árboles filogenéticos posibles. Los análisis filogenéticos bayesianos requieren el establecimiento de *priors*, asunciones *a priori* que resumen las expectativas que se tienen sobre las secuencias. En nuestro caso, previamente, se determinó el mejor modelo de evolución con la ayuda del programa MrModeltest v.2 (Nylander, 2004). Una vez seleccionado el modelo (GTR+I+G) se realizaron los análisis bayesianos cada uno con 4 cadenas de Markov y 2 millones de generaciones. Los valores de los parámetros para el modelo fueron estimados a partir del alineamiento. Se muestrearon los árboles cada 1000 generaciones y el árbol consenso final se contruyó con el mismo programa MrBayes. La convergencia de los distintos análisis se comprobó mediante la medida *ad hoc* ofrecida por el programa. La fiabilidad de los distintos clados de los árboles se comprobó mediante la probabilidad posterior.

Los árboles resultantes de ambos análisis filogenéticos fueron visualizados y editados empleando el programa FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis se emplearon secuencias de 88 (*trnLF*) y 148 (ETS) muestras pertenecientes a 15 taxa del total de ~ 18-22 especies del género (Anexo 1). 70 de estas secuencias se obtuvieron para este trabajo y las restantes se recogieron de la base de datos existente en el Área de Botánica de la Facultad de Ciencias. 95 (ETS) y 37 (*trnLF*) secuencias corresponden a especies Asiáticas e Africanas de la sección *Ataxia*. En concreto, en las especies sudafricanas se han obtenido nuevas secuencias para 7 poblaciones de *A. ecklonii*, 3 de *A. tongo* y 2 de *A. dregeanum* y *A. madagascariensis*.

### *Árboles filogenéticos*

Los resultados de los análisis filogenéticos basados en parsimonia y en inferencia bayesiana fueron coherentes, si bien el análisis bayesiano ofreció, por regla general, un mayor nivel de apoyo estadístico. En el trabajo se mostrarán los resultados de este último análisis.

Los árboles nuclear (Fig. 4) y plastídico (Fig. 5) dieron resultados solo parcialmente coherentes, si bien en ambos casos *Hierochloë* y *Anthoxanthum* (ambas secciones) aparecen como grupos hermanos. Esta relación ha sido observada en numerosos estudios previos (Quintanar et al., 2007). La principal diferencia entre los resultados de ambos análisis es la posición relativa del diploide mediterráneo *A. gracile* y las secciones *Anthoxanthum* y *Ataxia*. En el análisis nuclear (Fig. 4) las secciones *Ataxia* y *Anthoxanthum* (incluyendo *A. gracile*) son hermanas, mientras que el análisis plastídico (Fig. 5) muestra a *A. gracile* como hermana de ambas secciones. En ambos casos los clados tienen un apoyo del 100%. La disposición relativa de *A. gracile* y las secciones *Anthoxanthum* y *Ataxia* podrían indicar un origen híbrido para *A. gracile*, pero nada en la morfología de este taxon apoya esta idea. Los linajes involucrados en el origen de *A. gracile* serían: (i) un linaje dentro de la sección *Anthoxanthum* (paterno) y (ii) un linaje previo a la separación de las secciones (materno). Este resultado no concuerda con lo observado en otros estudios (Connor, 2012), que señalan un posible origen híbrido para la sección *Ataxia*. Su estructura floral, intermedia entre la sección *Anthoxanthum* y *Hierochloë* apoyaría esta idea, pero nuestro análisis no lo indica.

La sección *Anthoxanthum* es claramente monofilética según el árbol basado en las secuencias ETS (Fig. 4) y en las secuencias plastídicas (excluyendo *A. gracile*). Dentro



Así, por ejemplo en ambos análisis se observa un clado constituido por el diploide late-mediterráneo *A. aristatum*, el poliploide *A. amarum*, endémico del NW Peninsular y, en el caso del árbol nuclear (Fig. 4), las poblaciones de Europa occidental del tetraploide *A. odoratum*. En el árbol plastídico este clado comprende únicamente poblaciones del Occidente Ibérico (Fig. 5).

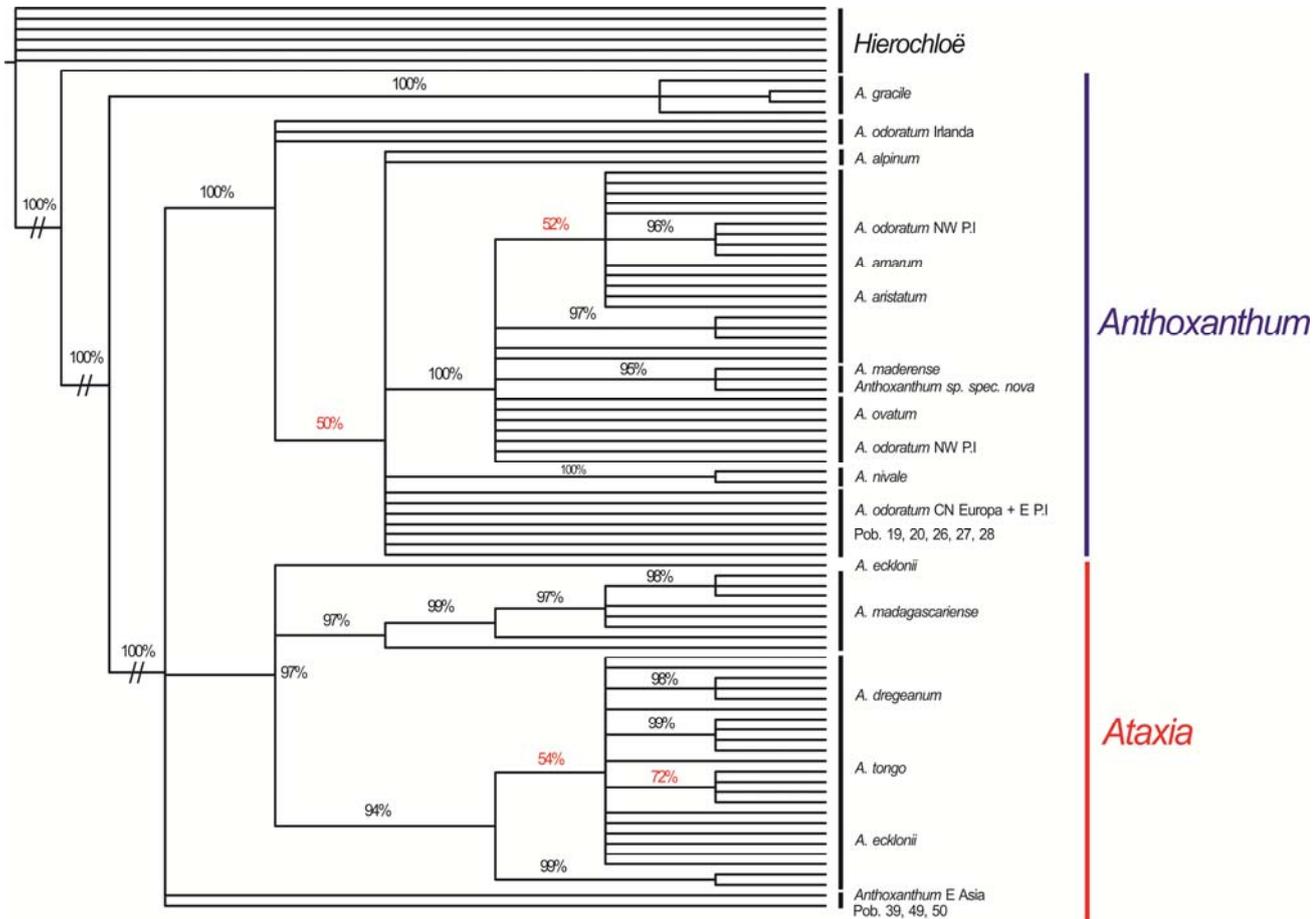


Figura 5.- Árbol filogenético basado en las secuencias del *trnLF* y obtenido por inferencia bayesiana. Los números sobre las ramas indican el nivel de probabilidad posterior (PS). Los números en rojo señalan valores de apoyo inferiores a 80. P. I., Península Ibérica; Pob., población.

Estos resultados parecen sugerir la existencia de un complejo poliploide constituido por las especies antes citadas, y señala que el origen del poliploide *A. amarum* está en linajes diploides mediterráneos. Como grupo hermano al anteriormente descrito se observa, en el árbol nuclear (Fig. 4), un clado constituido por la especie diploide Mediterránea *A. ovatum* y las especies Macaronésicas endémicas de Madeira y las Islas Canarias. Esto apoya la teoría de diversos autores (Franciso-Ortega *et. al*, 1996) de que

las especies macaronésicas no tuvieron su origen a partir de África, si no que en su mayoría provienen de linajes mediterráneos. Este grupo no está resuelto en el árbol plastídico.

La topología obtenida a partir de los ETS muestra también la proximidad entre los componentes del complejo poliploide formado por *A. alpinum* (diploide) y las poblaciones del C y N de Europa de *A. odoratum* (tetraploide). Así, la especie *A. odoratum* presenta dos grupos tetraploides, uno en Centro y Norte de Europa y otro en Europa Occidental. Este resultado sugiere que los linajes tetraploides han surgido en más de una ocasión en la evolución del género.

#### *Especies Africanas de Anthoxanthum. Sección Anthoxanthum*

Ninguna de las topologías obtenidas resuelve exactamente la posición de la especie Afroalpina-Oriental *A. nivale*. Sin embargo, en todos los casos se asocia con los grupos Europeos de la sección *Anthoxanthum*. Este resultado indica que la colonización de las montañas del E de África tuvo lugar a partir de linajes Europeos. Nuestros resultados, además, no indican que exista una relación directa entre *A. nivale* y las especies Sudafricanas-Malgaches. La relación estrecha entre la flora Afroalpina y Europea ha sido señalada en numerosas ocasiones (Hedberg, 1970).

#### *Especies Africanas de Anthoxanthum. Sección Ataxia*

La sección *Ataxia* es claramente monofilética en el análisis nuclear (Fig. 4), no así en el plastídico en el que las especies Asiáticas de la sección no están resueltas (Fig. 5). En el estudio basado en las secuencias nucleares se observan dos clados en la sección, uno constituido por las especies Sudafricanas y Malgaches, y un segundo grupo de especies Asiáticas. Esta relación estrecha señala una posible segunda colonización del continente africano por el género *Anthoxanthum*. Esta vez la colonización sería protagonizada por especies Asiáticas de la sección *Ataxia*, que poblaron la zona del Cabo y Madagascar. Las especies sudafricanas de *Anthoxanthum* (*A. dregeanum*, *A. ecklonii* y *A. tongo*) están distribuidas por la Provincia Occidental del Cabo y por las montañas escarpadas del este de Sudáfrica, y son parte de la muy endémica flora del Cabo. Si bien nuestra filogenia no nos permite conocer la dirección de la colonización, los estudios acerca de la flora Capense (Linder, 2003), señalan la existencia de diversos geoelementos en la misma:

- Especies Eurasiáticas, que han migrado recientemente hacia el sur a través de las montañas de África (antes de la formación del Desierto del Sahara).
- Linajes migrantes desde Australasia (a través de diversos eventos de migración a larga distancia).
- Linajes formados en la propia región Capense

Según nuestro estudio, el género *Anthoxanthum* formaría parte de los elementos de origen Australásico. De acuerdo con distintos autores (Yoder & Nowak, 2006; Warren, 2010), estas migraciones debieron su éxito a la emergencia intermitente de numerosas islas (“*stepping-stones*”) entre la zona sur de Asia y Madagascar en los últimos 5 millones de años a causa de las oscilaciones en el nivel del mar. Asimismo, las corrientes oceánicas y los fuertes vientos monzónicos desde Australasia en dirección a África, que se dan durante el llamado “*Indian Summer*”, podrían haber servido de ayuda en este proceso.

Las especies Sudafricanas forman un clado monofilético en la topología nuclear (Fig. 4), pero no así en la plastídica (Fig. 5) en la que la posición de *A. madagascariensis* no está resuelta. El análisis nuclear detecta un grupo muy diferenciado formado por las especies morfológicamente cercanas *A. dregeanum* y *A. tongo*, que resultan ser no monofiléticas. Ambas especies se localizan en el Cabo Occidental y poseen hábitats muy similares, estando limitadas a zonas de media montaña (800 m de altitud) y de cierta humedad edáfica. La distribución y ecología de estas especies podría deberse a oscilaciones climáticas, muy marcadas en el Pleistoceno en Sudáfrica (Partridge, 1999; Linder, 2003). Estos hechos pudieron ser la causa de que estas especies, de metabolismo C3, quedasen restringidas a áreas altas en la parte SW de la región del Cabo, donde la humedad edáfica es mucho mayor y donde son capaces de competir contra la dominancia de las plantas C4. Nuestros resultados parecen apoyar a aquellos autores que sugieren una fusión de ambas especies, si bien habría que estudiar más poblaciones para asegurarlo.

Otro grupo diferenciado de especies Sudafricanas lo constituye *A. ecklonii*. Es una especie que se encuentra en las montañas escarpadas del este de Sudáfrica, como los Montes Drakensberg, y ocupa un hábitat similar a *A. dregeanum* y *A. tongo*, si bien requiere más humedad. Su anatomía floral se acerca más a la característica de especies europeas, sin embargo, los análisis moleculares contradicen esta idea.

El último clado está formado por *A. madagascariense*, una especie que ocupa las montañas centrales de Madagascar. Al igual que el resto de la sección *Ataxia*, *A. madagascariense* habita en zonas de montaña, aunque en este caso a mucha más altura (más de 2000 m en la cordillera central de Madagascar –Ankaratra). A diferencia de Sudáfrica, el clima en Madagascar es más marcadamente tropical, lo que obliga a las plantas C3 a refugiarse en zonas más altas.

### *Conservación*

Los rápidos cambios ambientales que se están dando actualmente suponen una gran amenaza para cualquier especie, pero afectan en gran medida a aquellas que habitan en áreas muy restringidas. Las especies Sudafricanas y Malgaches de *Anthoxanthum* son un claro ejemplo. El sur de África, por sus condiciones climáticas, está dominado por plantas C4 capaces de alcanzar altas tasas de fotosíntesis a altas temperaturas. Es por ello que plantas C3 como *Anthoxanthum* quedan reducidas a áreas donde los niveles de humedad y de agua disponible son lo suficientemente elevados (y las temperaturas suficientemente bajas) como para que lleguen a dominar frente a las C4. Así, se refugian en zonas medias y altas de sistemas montañosos (e.g. Drakensberg en Sudáfrica y Ankaratra en Madagascar).

Debido a las diferencias de requisitos ecológicos de plantas C3 y C4, factores relacionados con el cambio climático tienen el potencial de cambiar el equilibrio dinámico en los ecosistemas (Ehleringer *et al.*, 1997; Collatz *et al.*, 1998; Bond and Midgley, 2000). Los principales factores que influyen en las abundancias relativas de especies C3 frente a las C4 son la temperatura, el agua, los nutrientes, el fuego y el estrés biótico (Mantlana *et al.*, 2008). La tendencia actual de aumento de temperatura reducirá aún más el hábitat disponible para las plantas C3 en las zonas cálidas, lo que afectará a las especies relictas y endémicas como las del género *Anthoxanthum* en el Sur de África.

BIBLIOGRAFÍA

- Bond WJ, Midgley GF. 2000. A proposed CO<sub>2</sub>-controlled mechanism of woody plant invasion in grasslands and savannas. *Global Change Biology* 6: 865–869.
- Clayton WD. 1970. *Flora of Tropical East Africa. Gramineae (Part 1)*. Crown Agents for the Colonies & A.A. Balkema. London.
- *CodonCode Aligner*. CodonCode Corporation. <http://www.codoncode.com>
- Connor HE. 2012. Flowers and floral biology of the holy grasses (*Hierochloe* and *Anthoxanthum*: Aveneae, Gramineae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 5(207): 323-333.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Ehleringer JR, Cerling TE, Helliker BR. 1997. C<sub>4</sub> photosynthesis, atmospheric CO<sub>2</sub> and climate. *Oecologia* 112: 285–299.
- Francisco-Ortega J, Crawford DJ, Santos-Guerra A. 1996. Chloroplast ADN evidence of colonization, adaptative radiation and hybridization in the evolution of the Macaronesian flora. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 4085-4090.
- Gillespie L, Handoll HHG. 2009. Prevention of falls and fall-related injuries in older people. *Injury Prevention* 15(5): 354-355.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2): 221-224.
- GPWG. 2001. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 38(3): 373-457.
- Hedberg O. 1970. Evolution of the Afroalpine Flora *Biotropica* 2: 16-23.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen B, Nei M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Version 2.1. USA: Arizona State University.
- Linder HP. 2003. The radiation of the Cape flora, southern Africa. *Biological Reviews* 78: 597-638.

- Linneo C. 1753. *Anthoxanthum*. P. 28. In: Stearn WT. Ed. 1957. *Species plantarum. A facsimile of the first edition*. London: Ray Society.
- Maddison, WP, Maddison DR. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75.
- Mantlana KB, Arneth A, Veenendaal EM, Wohland P, Wolski P, Kolle O, Wagner M, Lloyd J. 2008. Photosynthetic properties of C<sub>4</sub> plants growing in an African savanna/wetland mosaic. *Journal of Experimental Biology* 59(14): 3941-3952.
- Nylander JAA. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala: Uppsala University.
- partial pressure on the global distribution of C<sub>4</sub> grasses: present, past and future. *Oecologia* 114: 441–454.
- Partridge TC, Granger DE, Caffee MW, Clarke RJ. 2003. Lower Pliocene Hominid Remains from Sterkfontein. *Science* 300(5619): 607-612.
- Peña C. 2011. Métodos de inferencia filogenética. *Peruviann Journal of Biology* 18(2): 265-267.
- Pimentel M, Sahuquillo E, Catalán P, 2007. Genetic diversity and spatial correlation patterns unravel the biogeographical history of the European sweet vernal grasses (*Anthoxanthum* L., Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 667-684.
- Quintanar A, Castroviejo S, Catalán P. 2007. Phylogeny of the Tribe Aveneae (Pooideae, Poaceae) inferred from plastid *trnT-F* and nuclear ITS sequences. *American Journal of Botany* 94(9): 1554-1569.
- Rambaut A. 2012. FigTree v.1.4.0. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, van der Mark P. 2005. *MrBayes 3.1 Manual*. San Diego: University of California at San Diego.
- Schouten Y, Veldkamp JF. 1985. A revision of *Anthoxanthum* including *Hierchlöe* (Gramineae) in Malesia and Thailand. *Blumea* 30: 319-351.
- Soreng RJ, Davis JI. 2000. Phylogenetic structure in Poaceae subfamily Pooideae as inferred from molecular and morphological characters: misclassification versus reticulation. In: Jacobs WL, Everett J, eds. *Grasses. Systematics and evolution*. Collingwood: CSIRO.

- Swofford DL. 2000. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0. Washington DC: Smithsonian Institution.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991 Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Torrecilla P, Catalán P, Rodríguez JAL, Olmstead RG. 2003. Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe Lolooneae and allies (Poeae, Pooideae) inferred from ITS and *trnL-F* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 517-541.
- Tutin TG, Walters SM, Chater AO, Webb DA, Valentine DH, Moore DM, Richardson IBK, Burges NA, Heywood VH. 1980. *Flora Europaea, Vol. 5: Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledones)*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Warren BH, Strasberg D, Bruggemann JH, Prys-Jones RP, Thébaud C. 2010. Why does the biota of the Madagascar regions have such a strong Asiatic flavor? *Cladistics* 26: 526-538.
- Yoder AD, Nowak MD. 2006. Has Vicariance or Dispersal Been the Predominant Biogeographic Force in Madagascar? Only Time Will Tell. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37: 405-431.

Anexo 1. Poblaciones empleadas en el estudio. v,n, número de Herbario. SANT, herbario de la Universidad de Santiago de Compostela.

**Section *Anthoxanthum*; *Anthoxanthum alpinum* Löve and Löve.** **1**, Francia: Chamonix-Mont Blanc: Brévent. vn, SANT 52191; **2**, Suecia: Norrbotten: 10 Km N Björkliden. vn, SANT 53394. ***Anthoxanthum amarum* Brot.** **3**, España: Asturias: Grandas de Salime: La Coba. N 43° 12' 50.7"/W 006° 58' 22.6". vn, SANT 65936. **4**, España: Asturias: Taramundi: Road between Taramundi and Teixoes. N 43° 21' 07.9"/W 007° 05' 46.7". vn, SANT 65935. **5**, Portugal: Guarda: Almeida: Castelo Bom. N 40° 36' 48.3"/W 006° 55' 13,1". vn, SANT 65933. **6**, Portugal: Viseu: Oliveira de Frades: Souto de Lafões. N 40° 44' 14,9"/W 008° 09' 39". vn, SANT 65932. **7**, Portugal: Aveiro: Águeda: Redonda. N 40° 32' 49.8"/W 008° 22' 53.6". vn, SANT 65934. **8**, España: Galicia: Lugo: Palas de Rei: Castelo de Pambre. N 42° 51' 33.4" / W 007° 56' 55.9". vn, SANT 65937. **9**, España: Galicia: A Coruña: Zas. N 43° 05' 52,7"/W 008° 54' 35,1". vn, SANT 62922. ***Anthoxanthum aristatum* Boiss.** **10**, España: Galicia: Pontevedra: Baiona: Cabo Silleiro. vn, SANT 52193 (2). **11**, España: Galicia: A Coruña: Ferrol: San Cristovo. vn, SANT 52196 (2). ***Anthoxanthum gracile* Biv.** **12**, Italia: Cerdeña: Iglesias: Lago Corsi. N 39° 20'23,6'' /E 008° 31'24,5''. vn, SANT 65965 (2). **13**, Italia: Cerdeña: Orune. N 40° 23'18,3'' /E 009° 22'13,2''. vn, SANT 65950. **14**, Grecia: Creta: Gouverneto: Katoliko Gorge. N 35° 35'27'' /E 024° 08'41,5''. vn, SANT 65947. ***Anthoxanthum maderense* Teppner.** **15**, Portugal: Madeira: Achada do Teixeira, camino al Pico Ruivo. vn, SANT 52178. ***Anthoxanthum* sp. Santos Guerra A., pers. comm.** **16**, España: Santa Cruz de Tenerife: La Palma (2). ***Anthoxanthum nivale* KSchum.** **17**, Uganda: Rwenzori: Upper Bigo Bog. vn, SANT 65955. **18**, Uganda: Virunga Volcanoes. vn, SANT 65956. ***Anthoxanthum odoratum* L.** **19**, España: Aragón: Huesca: Benasque: La Renclusa. vn, SANT 52210. **20**, España: Aragón: Teruel: Albarracín: Fuente Buena. vn, SANT 52212. **21**, España: Galicia: Lugo: Folgoso do Courel: Taro Blanco. vn, SANT 53364. **22**, España: Galicia: Lugo: O Corgo: Marei. vn, SANT 53424. **23**, Irlanda: Wicklow County: Little Sugar Loaf. vn, SANT 65957. **24**, Irlanda: Wicklow County: Carrigoona. vn, SANT 65959. **25**, Irlanda: Dublin County: Carrickgollogan. vn, SANT 65958. **26**, Suecia: Uppsala County: Gamla Uppsala. vn, SANT 53402. **27**, Francia: Hautes Alpes: Col de Lautaret. vn, SANT 53387. **28**, República Checa: Rokytnice: Jehlanka chalet. vn, SANT 52208 (3). ***Anthoxanthum ovatum* Lag.** **29**, Grecia: Creta: Imbros: Imbros Gorge. N 35° 14' 48.0'' /E 024° 10' 0.30''. vn, SANT 65967. **30**, Grecia: Creta: Omalos Plain. N 35° 19' 25.0''/E 23° 53' 31.2''. vn, SANT 65966. **31**, Italia: Cerdeña: Iglesias: Fluminimaggiore. N 39° 27' 01.5''/E 008° 28' 15.7''. vn, SANT 65970 (3). **32**, Grecia: Achaia: Kalogria. N 38°08'50''/E 21° 23' 05.3''. vn, SANT 65968. **33**, Marruecos: Boukhalef Sovahel: 15 Km SW Tanger. vn, SANT 65971 (2). **34**, España: Andalucía: Huelva: Doñana: El Acebuche. vn, SANT 53378. **35**, España: Andalucía: Huelva: Doñana: Laguna de Santa Olalla. vn, SANT 53366. **36**, España: Andalucía: Cádiz: Jerez de la Frontera: Puerto de Gáliz. vn, SANT 65969. **37**, Marruecos: Carretera de Tiflet a Si AifaelBahraoui: Bosque de Mamora. vn, SANT 65972. **38**, Montenegro: Lovcen National Park. vn, SANT 65964; 7 ETS Clones (GB KC898100- KC898106). **Section *Ataxia*; *Anthoxanthum angustum* (Hitche.) Owhi.** **39**, New Guinea: W Highland District: 1 mile N of

Tubonjas Lutheran Mission. H n.c. *Anthoxanthum dregeanum* Stapf **40**, Sudáfrica: Western Cape: Swartberg Pass. vn, SANT 65938 (11). **41**, Sudáfrica: Western Cape: Stellenbosch: Jonkershoek. vn, SANT 65939 (6). *Anthoxanthum ecklonii* Stapf. **42**, South Africa: Eastern Cape: Stutterheim: Amatole Mountains: Mt Thomas. vn, SANT 65940 (11); **43**, Sudáfrica: Eastern Cape: Amatole Mountains: Gaika's Kop (5). **44**, Sudáfrica: Eastern Cape: Amatole Mountains: Zingcuka Swamp (10). **45**, South Africa: Eastern Cape: Stutterheim: Amatole Mountains: Dohne Swamp. vn, SANT 65943 (12). **46**, Sudáfrica: KwaZulu Natal: Drakensberg: Sani Pass (6). **47**, Sudáfrica: KwaZulu Natal: Drakensberg: Didima (10). **48**, Sudáfrica: KwaZulu Natal: Drakensberg: Mahlangubo River (7). *Anthoxanthum hookeri* Rendle. **49**, China: Kunming Municipality: Qiongzhusi Temple. vn, MO3619761. *Anthoxanthum horsfieldii* (Kunth) Mez. **50**, Taiwan: Nantou County, Jen-ai Hsiang, Hsiao-feng-kou. E 121° 17' 23"/N 24° 9' 59" vn, SANT 65951. *Anthoxanthum madagascariense* Stapf. **51**, Madagascar: Ankaratra Mts: Tambunana, Tsiafajavjona community; SW of Tsiafajavona Mt. vn, SANT 65953 (6). **52**, Madagascar: Ankaratra (4). *Anthoxanthum tongo* Stapf. **53**, Sudáfrica: Western Cape: Ceres: Gydo's Pass. vn, SANT 65976 (4). **54**, Sudáfrica: Western Cape: Cape Town: Table Mountain. **55**, Sudáfrica: Western Cape: Sir Lowry's Pass. *Hierochloë. Hierochloë hirta* Hayek. **56**, Noruega: Hedmark: Hamar. O 313689 (3); **57**, Noruega: Troms: Nordreisa. O 285489; **58**, Noruega: Oppland: Vågå. O 1544547. *Hierochloë odorata* (L.) PBeauv. **59**, Norway: Akerhus: Ås. O 276430. *Hierochloë redolens* R.Br. **60**, Chile: Tierra del Fuego: Lago Roca. SANT 65929.